

食品加工および資材の新知識

New Food Industry

New food indust. 60 (12): 2018.

12

- かまぼこの火戻り発生温度での加熱に伴うワニエソ筋原線維の微細構造の変化
- 大豆加工素材の添加が食パンの膨化および嗜好性に及ぼす影響
- 高尿酸血症を抑制するファイトケミカル素材
- オメガ-3脂肪酸合成細菌の新たな利用
- 椎茸菌糸体培養培地抽出物 (LEM) 由来
水溶性リグニン画分 (JLS-18) の抗アレルギー効果

酸化防止剤

B H A
B H T
サステン乳液A
サステン乳液T

Sustane



日揮工業株式会社

触媒化成品営業部 / 東京都品川区大崎 1-6-3 日精ビル
電話(03)5436-8470 FAX(03)3493-9125

New Food Industry

食品学術誌のご案内

◆この雑誌についてのお問合せ◆

TEL : 042-312-0836

エヌエフアイ合同会社 検索

New Food Industry とは

月刊「New Food Industry」誌は、1959（昭和 34）年に創刊以来、食品業界の発展を目指す斯界の研究者ならびに教育機関の先生方などのご助言、ご協力をいただきながら 60 年の歴史を歩んで参りました。これまで途絶えることなく 60 年間に亘り発行を続けられたことは、我が国の食品業界における学術誌としては稀有の存在であり、今日の食品業界の発展に少なからず寄与しているものと自負しております。

年間購読料

雑誌コード：89591

前払い：1冊 2,160円（税込）×12ヵ月 10%割引 23,328円

送料【100円】×12ヵ月 1,200円 合計：24,528円

後払い：定価

◆ご注文は FAX またはメールにて FAX:042-312-0845 info@nfi-llc.co.jp

原著論文

- かまぼこの火戻り発生温度での加熱に伴う
ワニエソ筋原線維の微細構造の変化
Ultrastructural changes of myofibril in lizardfish (*Saurida wanieso*)
under heating condition of himodori kamaboko
..... 宮崎 貴美子, 宮崎 里帆, 王 曜, 曹 敏傑,
竹下 哲史, 平坂 勝也, 橘 勝康, 谷山 茂人 1
- 大豆加工素材の添加が食パンの膨化および嗜好性に及ぼす影響
The effect of the addition of processed soybean ingredients
on the swelling and palatability of bread
..... 平尾 和子, 三星 沙織, 古谷 彰子, 中塚 康雄, 米山 陽子 8

論説

- 高尿酸血症を抑制するファイトケミカル素材
Phytochemicals with Anti-hyperuricemic Potential: Studies in Cultured
Hepatocytes and Purine Bodies-Induced Hyperuricemic Model Mice
..... 矢ヶ崎 一三, 安達 真一 19
- オメガ-3 脂肪酸合成細菌の新たな利用
Novel use of omega-3 fatty acid-producing bacteria
..... 奥山 英登志, 渡部 和郎 27
- 椎茸菌糸体培養培地抽出物 (LEM) 由来
水溶性リグニン画分 (JLS-18) の抗アレルギー効果
Anti-allergic effects of a water-soluble lignin rich fraction (JLS-18) prepared
from the extract of culture medium of *Lentinus edodes* mycelia (LEM)
..... 小早川 幸子, 神内 伸也, 田口 雄也, 立野 良治,
岩田 直洋, 飯塚 博, 日比野 康英 42

解説

- ニジマス用飼料の炭水化物源-3
..... 酒本 秀一 49

- グルテンフリー-穀物 食品と飲料, グルテンの検知-3
..... 瀬口 正晴, 竹内 美貴, 中村 智英子 58

連載

- デンマーク通信 デンマークのりんご
..... Naoko Ryde Nishioka 70

- 野山の花 — 身近な山野草の食効・薬効 —
オオバコ *Plantago asiatica* L. (オオバコ科 Plantaginaceae)
..... 白瀧 義明 72

漢方の効能

- (3) 東アジア文化圏の共通言語としての漢方
..... 門脇 修一郎 75

おいしさと健康に真剣です。

酵母エキス系調味料

コクベス

セラチン&小麦グルテン

酵素分解調味料

エンザップ

new発酵調味料

D&M

ディアンドエム

DM

大日本明治製糖株式会社

食品事業部

酵素分解調味料なら
大日本明治製糖へ

新発売! 乳製品にベストマッチな調味料
コクベス
ラクティックイーストエキス
乳加工品・製パン・製菓・チーズ・バターへの
コクづけ、味や風味の底上げなど、ユニークな
特長がある乳酵母エキスです。

〒103-0027 東京都中央区日本橋1-5-3 日本橋西川ビル7F TEL (03) 3271-0755

消費者向け商品『スマート生活応援サプリ』シリーズを発売 第1弾は、水溶性食物繊維の『ファイバリクサ® 顆粒』

このたび、NAGASE グループの株式会社林原（本社：岡山県岡山市北区 代表取締役社長：安場直樹）は、消費者向け商品『スマート生活応援サプリ』シリーズを新たに発売いたします。そのシリーズ第1弾は、林原の独自素材である水溶性食物繊維を顆粒にした『ファイバリクサ® 顆粒』で、11月27日に新発売いたしました。

また、シリーズ第2弾として、2019年1月には柑橘ポリフェノールを使用した『へすぺり美人®』も発売する予定です。

今後、林原は、多様化する消費者ニーズに合わせ、当シリーズの拡充を図り、「人々の健康で快適な生活に寄与する商品づくり」を続けて参りたいと考えております。



商品名	ファイバリクサ® 顆粒
内容量	30包 (3g/包) 食物繊維含量 2.4g/包
商品の特長	持ち運びに便利なスティックタイプで、飲み物や食事にサッと混ぜるだけで手軽に水溶性食物繊維を摂取することが可能です。
商品サイズ	(奥行×横×高さ) 65mm × 145mm × 100mm
包装形態	アルミスティック / 化粧箱
小売希望価格	2,000円 (税込)
賞味期限	2年
販売方法	通信販売 林原 e-shop (web 通販ショップ) http://www.hayashibara-eshop.jp/ TEL. 0120-05-8848 (受付 / 平日 9:00 ~ 17:00)

かまぼこの火戻り発生温度での加熱に伴う ワニエソ筋原線維の微細構造の変化

Ultrastructural changes of myofibril in lizardfish (*Saurida wanieso*)
under heating condition of himodori kamaboko

宮崎 貴美子 (MIYAZAKI Kimiko)¹ 宮崎 里帆 (MIYAZAKI Riho)² 王 曜 (WANG Yao)¹
曹 敏傑 (CAO Min-Jie)³ 竹下 哲史 (TAKESHITA Satoshi)¹ 平坂 勝也 (HIRASAKA Katsuya)¹
橘 勝康 (TACHIBANA Katsuyasu)¹ 谷山 茂人 (TANIYAMA Shigeto)^{1,*}

¹ 長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科, ² 東筑紫短期大学食物栄養学科, ³ 集美大学食品与生物工程学院

Key Words : 火戻り 筋原線維 微細構造 緑豆トリプシンインヒビター (MBTI) E-64

Ultrastructural changes of myofibril in lizardfish (*Saurida wanieso*) under heating
condition of himodori kamaboko

Kimiko Miyazaki¹ Riho Miyazaki² Yao Wang¹ Min-Jie Cao³ Satoshi Takeshita¹ Katsuya Hirasaka¹
Katsuyasu Tachibana¹ Shigeto Taniyama^{1,*}

¹ Laboratory of Food Nutritional Science, Graduate School of Fisheries and Environmental Sciences,
Nagasaki University

² Department of Food Dietetics, Higashichikushi Junior College

³ College of Biological Engineering, Jimei University

[Key words: himodori, myofibril, ultrastructure, mung bean trypsin inhibitor (MBTI), E-64]

Abstract

Ultrastructural changes of myofibril (Mf) in lizardfish (*Saurida wanieso*) under the heating condition of himodori kamaboko were observed; in the meantime, effects of protease inhibitor (PI) addition on himodori phenomenon were examined. Mf suspension was prepared from lizardfish, then heated at 40°C (Mf-40) and 50°C (Mf-50) for 30 min without PI addition. Besides, Mung bean trypsin inhibitor (MBTI: 56 μM) or cysteine PI (E-64: 10 μM) was added to Mf suspension before heating at 50°C for 30 min. Compare with Mf-40, decreased levels of myosin heavy chain (MHC), tropomyosin and low molecular proteins (lower than actin) were observed in Mf-50 by SDS-PAGE and immunoblotting (anti-MHC IgG and anti-tropomyosin IgG). Fine ultrastructure was observed in Mf-40 by using transmission electron microscope; however the filament structure of Mf, especially actin filament, failed to be observed in Mf-50. In contrast to PI additive-free Mf suspension, degradation of MHC and tropomyosin were inhibited in part by MBTI and E-64 treatment. The electron density of I band in Mf treated by PI addition showed higher tendency than PI additive-free Mf, and fine filament structure of Mf was also maintained in part by MBTI treatment. These results suggest that tropomyosin may be deeply related to the collapse of ultrastructure; moreover, PI addition, especially MBTI, may have the ability to suppress the protein degradation and collapse of structures under the heating condition of himodori kamaboko.

要約

かまぼこの火戻り発生温度での加熱に伴うワニエソ筋原線維 (Mf) の微細構造の変化を検討した。また、Mf 懸濁液にプロテアーゼインヒビター (PI) を添加したときの影響についても検討を加えた。Mf 懸濁液に PI を添加せずに 40℃または 50℃で 30 分間加熱した。また、Mf 懸濁液に緑豆トリブシンインヒビター (MBTI: 終濃度 56 μM) または E-64 (終濃度 10 μM) を添加して 50℃で 30 分間加熱した。SDS-PAGE とイムノブロットングにて、PI 無添加の 50℃加熱の Mf ではミオシン重鎖 (MHC) やトロポミオシン、アクチンより低分子域にみられる幾つかのバンドが 40℃加熱 (PI 無添加) の Mf より若干淡くなった。さらに、Mf の透過型電子顕微鏡観察にて、40℃加熱 (PI 無添加) ではフィラメントの横紋構造が明瞭に観察されたが、PI 無添加の 50℃加熱ではその構造が不明瞭になっており、特に明帯フィラメントの消失が著しかった。一方、Mf 懸濁液に MBTI や E-64 を添加して 50℃加熱すると、電気泳動的には PI 無添加の 50℃加熱と比較して MHC やトロポミオシンの分解が幾分抑制された。また、形態学的にも PI 無添加の加熱と比較して明帯の電子密度が高い傾向にあり、MBTI においては一部に Mf のフィラメント構造が維持されていた。以上より、ワニエソ Mf の火戻り発生温度での加熱に伴う微細構造の崩壊には明帯を構成するトロポミオシンが深く関与していることが明らかとなった。また、PI、特に MBTI の添加により 50℃での加熱に伴うタンパク質の分解や構造崩壊が幾分抑制可能であると考えられた。

はじめに

魚肉練り製品では、足と呼ばれる弾力に富んだ独特の食感とその品質を決定するうえで重要な要素のひとつとなっている。そのうち、かまぼこでは魚肉の塩ずり身を 40～50℃で加熱して坐りを起こさせた後、75～90℃で本加熱することで足が形成される。これは、一段目の加熱 (一次加熱) で筋原線維タンパク質が適度に変性して網目構造ができ、二段目の加熱 (二次加熱) で激しい熱変性作用によってタンパク質分子間にさらに多数の架橋ができて網目構造が丈夫になることによる¹⁾。しかしながら、かまぼこ製造時の加熱処理中に温度管理を怠ると、火戻りと呼ばれる品質劣化現象が発生することがある。火戻りとは、一度形成されたゲルが 50～70℃の中間温度帯を通過している間に劣化し、指で軽く押すだけで崩れてしまうほど弾力である足が激しく減退する現象であり^{1,2)}、この現象が発生したかまぼこは商品価値がほとんど無く、産業上の経済的損失は大きい。

ところで、かまぼこのゲル形成性を担っているのは魚肉タンパク質の大部分を占める筋原線維タンパク質であり、それ自体の特性や加熱によって起こる構造変化が製品の品質を左右すると考えられる。著者らは、火戻り条件である 55～60℃の加熱においては加熱後に形成さ

れるゲルの組織構造が崩壊することを報告している³⁻⁵⁾。また、同様の温度条件下ではミオシン重鎖 (MHC)、アクチン、 α -アクチニン、トロポミオシンなどの筋原線維を構成する重要なタンパク質が分解するとの知見を得ている³⁻⁵⁾。つまり、ゲルの組織構造の崩壊には、これらタンパク質の分解に伴う筋原線維の微細構造の変化が影響していると考えられるが、その詳細は不明である。一方、火戻りの発現には、セリンプロテアーゼやシステインプロテアーゼ等の筋肉プロテアーゼの関与が有力視されている^{6,7)}。この点について、著者らは、緑豆由来のトリブシンインヒビター (MBTI) の添加が火戻りがある程度抑制することを報告している³⁾。

そこで本研究では、高級かまぼこの原料魚の一種であるワニエソ *Saurida wanieso* を用い、火戻り発生温度での加熱に伴う筋原線維の微細構造の変化を形態学的に明らかにすることを目的とした。また、MBTI を含む 2 種のプロテアーゼインヒビター添加による筋原線維の微細構造の変化への影響についても検討した。

2. 実験方法

2-1. 試薬

プロテアーゼインヒビター (PI) は以下の 2 種を用いた。セリン PI として、既報⁸⁾に従っ

Table 1. Inhibitory effect of MBTI and E-64 on protease activities in leached minced meat of lizardfish

Protease	Protease inhibitor	Final concentration(μM)	Relative activity (%)
Serine ¹⁾	MBTI	0	100
		5.6	72
		56	24
Cysteine ²⁾	E-64	0	100
		1	5
		10	1

¹⁾ Serine protease activity was determined by the addition of Boc-Phe-Ser-Arg-MCA to a final concentration of 5 μM with or without MBTI. The activity was reacted at pH 8.0 and 55°C for 10 min.

²⁾ Cysteine protease activity was determined by the addition of Z-Phe-Arg-MCA to a final concentration of 2 μM with or without E-64. The activity was reacted at pH 5.5 and 37°C for 6 min.

て調製した MBTI を用いた。この精製 MBTI による阻害活性試験を既報⁹⁾ に準拠して行った結果 (Table 1), 後述の MBTI 添加モデルへの添加量 (終濃度) はセリンプロテアーゼ活性を抑制可能な 56 μM とした。また, システイン PI として E-64 (ペプチド研究所製) を用い, 後述の E-64 添加モデルへの添加量 (終濃度) は同様に阻害活性試験¹⁰⁾ から (Table 1), システインプロテアーゼ活性を抑制可能な 10 μM とした。

2-2. 筋原線維の調製と加熱

試料魚として, 2015 年 9 月に長崎県近海で漁獲後, 氷蔵したワニエソ (平均体長 30.8 \pm 5.4 cm, 平均体重 397.4 \pm 217.3 g, n=3) を長崎魚市場より購入して用いた。筋原線維 (Mf) は, 既報¹¹⁾ に準じて試料魚の普通筋から調製し, 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) に懸濁させた後 (タンパク質濃度 5 mg/mL), PI を添加せずに 40°C または 50°C でそれぞれ 30 分間加熱した。一方, Mf 懸濁液に MBTI (終濃度 56 μM) または E-64 (終濃度 10 μM) を添加し, それぞれ 50°C で 30 分間加熱した。また, PI 無添加で非加熱の Mf 懸濁液を対照とした。なお, 本研究での 40°C 加熱とは通常のかまぼこ作製時の一次加熱温度, 50°C 加熱とは既報^{2,3,5)} に準じて実験的に火戻りが生じる加熱条件として設定した。

2-3. SDS-PAGE およびイムノブロットティング

SDS-PAGE およびイムノブロットティングは, 非加熱および加熱した各 Mf 懸濁液を遠心分離し, 沈殿を 1% SDS 溶液に溶解させた後, 著者ら¹²⁾ の方法に準じて行った。なお, イムノブロットティングにおける一次抗体にはマウス由来抗ヒト MHC 抗体およびラット由来抗ブリトロポミオン抗体を用い, 二次抗体にはそれぞれペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG ヒツジ IgG (Developmental Studies Hybridoma Bank 製) およびペルオキシダーゼ標識抗ラット IgG ヤギ IgG (Organon Teknica 社製) を用いた。

2-4. 筋原線維の透過型電子顕微鏡観察

筋原線維の透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察試料の作製は, 非加熱および加熱した各 Mf 懸濁液を前固定 (2% グルタルアルデヒド, 0.15 M リン酸緩衝液, pH 7.2) し, アガロースで固め, その後は著者ら¹³⁾ の方法に準じて行った。すなわち, 後固定 (1% 四酸化オスミウム, 0.15 M リン酸緩衝液, pH 7.2), アセトンの上昇系列で脱水, エポキシ樹脂包埋を行った後, 超マイクローム (RMC 社製 MT-6000 型) を用いてダイヤモンドナイフで薄切, 酢酸ウラン・クエン酸鉛の電子染色を行い, TEM (日本電子製 JEM-1011 型) にて加速電圧 80 kV で観察した。

3. 結果

3-1. SDS-PAGE

SDS-PAGE において、40°C加熱 (PI 無添加) では非加熱 (PI 無添加) と同様の泳動パターンを示した。しかしながら、PI 無添加の 50°C 加熱では分子量 200 kDa 付近の MHC の減少が認められ、さらに 45 kDa 付近のアクチンより低分子域にみられるバンド A ~ D (38 kDa, 26 kDa, 23 kDa, 22 kDa より低分子域) が 40°C 加熱のものより若干淡くなった。一方、Mf 懸濁液に MBTI あるいは E-64 を添加して 50°C 加熱したところ、200 ~ 45 kDa におけるバンドの様相は 40°C 加熱 (PI 無添加) と同様であったが、それより低分子域のバンド A ~ D は PI 無添加の 50°C 加熱と同様、淡くなっていた (Fig. 1)。

3-2. イムノブロッティング

抗ヒト MHC 抗体を用いたイムノブロッティングにおいて、いずれも MHC 相当部位に抗原陽性反応が認められたが、PI 無添加の 50°C 加熱では MHC の分解産物と考えられるバンドが 40°C 加熱 (PI 無添加) より濃く検出された。

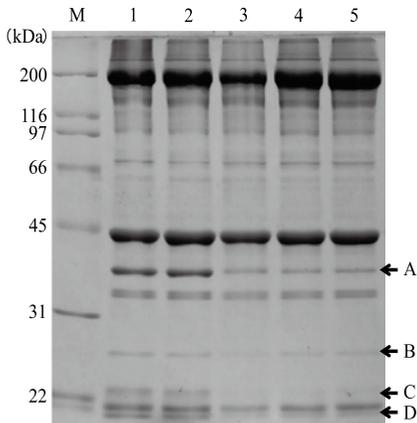


Fig.1. SDS-PAGE analysis on the degradation of myofibrillar proteins in the skeletal muscle of lizard fish. Each myofibril suspension was solubilized in the SDS-urea solution and applied on SDS-PAGE using 10% gel. Lanes; M, molecular marker; 1, non-heated; 2, heated for 30 min at 40°C without PI; 3, heated for 30 min at 50°C without PI; 4, heated for 30 min at 50°C with MBTI (56 μ M); 5, heated for 30 min at 50°C with E-64 (10 μ M). Arrows (A-D) indicate the protein degradation.

一方、Mf 懸濁液に MBTI あるいは E-64 を添加したところ、MHC の分解産物と考えられる反応は PI 無添加の 50°C 加熱よりも淡かったが、40°C 加熱 (PI 無添加) でみられる分解産物よりさらに低分子域に若干の抗原陽性反応が認められた (Fig. 2)。また、抗ブリトロポミオシン抗体を用いたイムノブロッティングにおいて、いずれもトロポミオシン相当部位に抗原陽性反応が認められたが、PI 無添加の 50°C 加熱では 40°C 加熱 (PI 無添加) と比較してトロポミオシン相当部位の反応が淡かった。一方、Mf 懸濁液に MBTI を添加したところ、PI 無添加または E-64 添加の 50°C 加熱より幾分抗原陽性反応が濃く検出された (Fig. 3)。

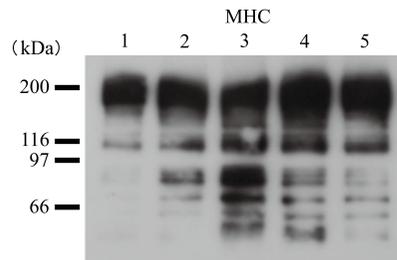


Fig. 2. Immunoblotting of the degradation of myosin heavy chain (MHC).

Myofibrils were SDS-treated and applied to SDS-PAGE same as Fig. 1. Proteins were then electrophoretically transferred to PVDF membrane and detected with mouse anti-MHC IgG. Lanes; 1, non-heated; 2, heated for 30 min at 40°C without PI; 3, heated for 30 min at 50°C without PI; 4, heated for 30 min at 50°C with MBTI (56 μ M); 5, heated for 30 min at 50°C with E-64 (10 μ M).

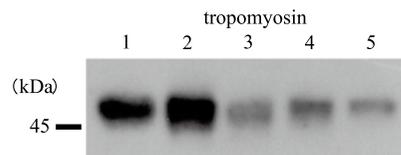


Fig. 3. Immunoblotting of the degradation of tropomyosin.

Myofibrils were SDS-treated and applied to SDS-PAGE same as Fig. 1. Proteins were then electrophoretically transferred to PVDF membrane and detected with rat anti-tropomyosin IgG. Lanes; 1, non-heated; 2, heated for 30 min at 40°C without PI; 3, heated for 30 min at 50°C without PI; 4, heated for 30 min at 50°C with MBTI (56 μ M); 5, heated for 30 min at 50°C with E-64 (10 μ M).

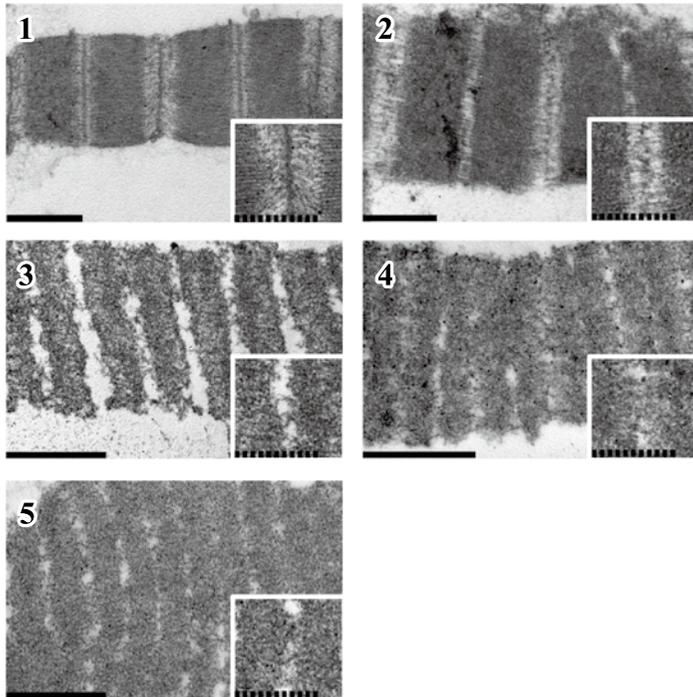


Fig. 4. Electron micrographs of myofibril of lizard fish.

1, non-heated; 2, heated for 30 min at 40°C without PI; 3, heated for 30 min at 50°C without PI; 4, heated for 30 min at 50°C with MBTI (56 μM); 5, heated for 30 min at 50°C with E-64 (10 μM). Each myofibril was prefixed with 2% glutaraldehyde and postfixed with 1% osmium tetroxide. The fixed myofibrils were dehydrated and embedded in epoxy resin. The sections were cut by ultramicrotome and were doubly stained with uranyl acetate and lead citrate. Solid bars and dotted bars represent 1 μm and 500 nm, respectively.

3-3. 筋原線維の TEM 観察

非加熱 (PI 無添加) の筋原線維は、明帯と暗帯が規則正しく並ぶ骨格筋特有の横紋構造を呈しており、明帯の中央には Z 線がジグザグ状に筋原線維を横断している様相が観察された。また、筋原線維を構成するフィラメント構造は筋原線維の長軸方向に明瞭に観察された。40°C 加熱 (PI 無添加) では、非加熱と比較すると幾分フィラメント構造が不明瞭になっていたが、概ね非加熱と同様の形態を維持していた。PI 無添加の 50°C 加熱では、明帯や暗帯の中央部分 (H 帯) の電子密度が極めて低く白く抜けており、Z 線および M 線は完全に消失していた。また、非加熱 (PI 無添加) および 40°C 加熱 (PI 無添加) で明瞭に観察されたフィラメ

ント構造が極めて不明瞭になっており、筋原線維の崩壊の様相が観察された。一方、MBTI 添加の 50°C 加熱では、明帯および暗帯の電子密度が PI 無添加の 50°C 加熱より高く、一部には筋原線維の長軸方向に走るフィラメント構造が維持されていた (Fig. 4 4 の拡大部)。E-64 添加の 50°C 加熱の場合においても同様、明帯および暗帯の中央部分 (H 帯) の電子密度が幾分高いようであったが、MBTI 添加の場合に認められたフィラメント構造は確認されなかった (Fig. 4)。

4. 考察

本研究では、かまぼこの火戻り発生温度での加熱に伴うワニエソ Mf の微細構造の変化を形態学的に明らかにした。さらに、そのときの MBTI と E-64 添加による影響を検討した。

SDS-PAGE において、50°C で 30 分間加熱した Mf (PI 無添加) は分子量 200 kDa 付近の MHC

や 45 kDa 付近のアクチンより低分子域にみられる幾つかのタンパク質バンドが 40°C 加熱のものと比較して若干淡くなっていた。また、イムノブロットングでは、PI 無添加の 50°C 加熱においては MHC 相当部位に抗原陽性反応が確認されたが、それより低分子域に MHC の分解産物と考えられるバンドが濃く検出された。さらに、トロポミオシン相当部位においても抗原陽性反応が淡くなっている様相が確認できたが、それより低分子域に限定分解産物と考えられるバンドが認められなかった。このことから、トロポミオシンの分解は極めて急速に進んだと考えられた。このように、PI 無添加での 40°C 加熱と 50°C 加熱での電気泳動的にみたタンパク質の挙動は異なる結果を示した。本研究にお

いて、40°C加熱とはかまぼこ製造時の一次加熱温度、50°C加熱とは火戻りが生じやすい温度として設定した実験的条件であるが、この10°Cの温度差が前述のタンパク質の挙動に影響を及ぼしたと考えられた。この点に関して、著者らはフナ *Carassius auratus* やコイ *Cyprinus carpio* の筋原線維を種々の温度で反応させたところ、MHC やトロポミオシンのタンパク質バンドは55°C付近でよく分解されており、これが筋原線維結合型セリンプロテアーゼ (MBSP) の作用によるものであると報告している^{14, 15)}。また、このMBSPはかまぼこのゲル強度を低下させる作用をもつことが明らかになっている¹⁵⁾。すなわち、本研究で用いたワニエソにおいても、50°Cでの加熱によって活性化したMBSPがMHCやトロポミオシンを分解したと考えられ、これらの分解がかまぼこ製造時のゲル強度の低下に影響する可能性が示唆された。

ところで、著者らはTEMでかまぼこの組織構造を観察し、通常のかまぼこは電子密度が異なる微細な粒子で構成され、比較的均一な構造を呈していたのに対し、火戻りが発生したかまぼこは電子密度が高く凝集した粒子や、その間に染色性が弱く白く抜けた部分が観察され、極めて粗な構造であったことを報告している^{3, 5)}。火戻り発生時の弾力低下はこのような組織構造の崩壊によって起こるものと考えられるが、ゲルを形成した状態ではその詳細なメカニズムを明らかにすることは極めて難しい。そこで本研究では、Mfに着目して微細構造の変化をTEMにて観察した。その結果、40°C加熱では非加熱のMfと同様、明帯と暗帯が規則正しく並ぶ骨格筋特有の横紋構造を呈していた。しかしながら、PI無添加の50°C加熱のMfでは明帯や暗帯の中央部分 (H帯) の電子密度が極めて低く白く抜け、Z線およびM線が完全に消失している様相が観察されたことから、火戻りが発生する温度では、特に明帯フィラメントが影響を受けることが示された。Mfの明帯は、アクチン分子で形成されるらせんの細い溝にトロポミオシンとトロポニンが結合してアクチンフィラ

メントを形成し、それをZ線に連結する役目を α -アクチニンが担っている¹⁶⁾。すなわち、明帯はアクチンやトロポミオシン、トロポニン、 α -アクチニンの相互作用で形成されているといえる。先の電気泳動の結果と併せ考えると、50°C加熱に伴いトロポミオシンが分解することによって、その相互作用が崩れ、明帯フィラメントは構造を維持出来なくなったと考えられた。他方、養殖マダイ *Pagrus major* を含むいくつかの魚種で、鮮度低下に伴う肉質軟化にはZ線の消失やその構成タンパク質である α -アクチニンの分解が大きく影響することが明らかにされている^{17, 18)}。しかしながら、著者らは火戻り発生温度にて α -アクチニンは分解しないことを報告している^{8, 9)}。このことから、本研究での50°C加熱に伴う明帯の構造崩壊には、 α -アクチニンの分解よりも、むしろトロポミオシンの分解による影響が非常に大きいと考えられた。

一方、Mf懸濁液にMBTIやE-64を添加して50°C加熱すると、電気泳動的にはPI無添加で加熱した場合と比較してMHCやトロポミオシンの分解が幾分抑制された。また、形態学的にもPI無添加の加熱と比較して明帯の電子密度が高い傾向にあり、MBTIにおいては一部にMfのフィラメント構造が維持されていた。この点に関して、火戻りの発現には、セリンプロテアーゼやシステインプロテアーゼの関与が知られている^{6, 7)}。また、マルアジ *Decapterus maruadsi* のMf懸濁液にMBTIまたはE-64を添加し、55°Cで2時間加熱すると、MHCやトロポミオシンを含むタンパク質分解がほぼ完全に抑制されており、これらPIは火戻り抑制効果を有すると報告されている⁸⁾。しかしながら、本研究においてE-64ではMfの明帯フィラメントの崩壊がMBTIと比較して抑制されていないことから、火戻りの加熱温度におけるワニエソMfの崩壊には、MBTIのほうがE-64より幾分抑制効果がみられると考えられた。

以上より、ワニエソMfの火戻り発生温度での加熱における微細構造の崩壊にはトロポミオ

シンが深く関与していることが明らかとなった。また、MBTIの添加によって50°Cでの加熱によるタンパク質の分解や構造崩壊が幾分抑制

されたことから、かまぼこ製造時においてもある程度の火戻り抑制が期待されるであろうと考えられた。

引用文献

1. 岡田 稔：第6章かまぼこの足. 新訂かまぼこの科学. 東京, 成山堂書店, 56-77, 2008.
2. 志水 寛, 吉本晴樹, 清水 亘：かまぼこの足について -XII. 日本水産学会誌, **28**: 610-615. 1962.
3. 宮崎里帆, 宮崎貴美子, 梁 佳, 他: ワニエソかまぼこの火戻り現象に及ぼす緑豆トリブシンインヒビター添加の効果. 日本食品化学学会誌, **22**: 175-180. 2015.
4. Jiang X. J., Zhang Z. J., Cai H.N., *et al.*: The effect of soybean trypsin inhibitor on the degradation of myofibrillar proteins by an endogenous serine proteinase of crucian carp. *Food Chem*, **94**: 498-503. 2006.
5. 濱田友貴, 廣瀬岳史, 川島 茜, 他: マダイかまぼこの火戻りに伴う物性の低下とその微細構造. 日本食品化学学会誌, **13**: 78-82. 2006.
6. 劉 達嘉, Nowsad A.AKM., 加納 哲, 他: スケトウダラ塩すり身の坐りに及ぼすセリンプロテアーゼ阻害剤の影響. 日本水産学会誌, **62**: 791-795. 1996.
7. 劉 達嘉, 加納 哲, 丹羽 栄二: スケトウダラ塩すり身の坐りに及ぼすシステインプロテアーゼ阻害剤の影響. 日本水産学会誌, **62**: 275-279. 1996.
8. Sun L.C., Yoshida A., Cai Q.F., *et al.*: Mung bean trypsin inhibitor is effective in suppressing the degradation of myofibrillar proteins in the skeletal muscle of blue scad (*Decapterus maruadsi*). *J. Agric. Food Chem.*, **58**: 12986-12992. 2010.
9. Cao M.J., Osatomi K., Hara K., *et al.*: Identification of a myofibril-bound serine proteinase (MBSP) in the skeletal muscle of lizard fish *Saurida wanieso* which specifically cleaves the arginine site. *Comp. Biochem. B.*, **125**: 255-264. 2000.
10. 木南英紀, 坂東祥晃: 生物化学実験書 30 蛋白質分解酵素 I. 鶴 大典, 船津 勝 編. 東京, 学会出版センター, 39-56, 1993.
11. Tokiwa T., Matsumiya H.: Fragmentation of fish myofibril. Effect of storage condition and muscle cathepsin. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **35**: 1099-1109. 1969.
12. Hirasaka K., Saito S., Yamaguchi S., *et al.*: Dietary supplementation with isoflavones prevents muscle wasting in tumor-bearing mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **62**: 178-184. 2016.
13. 肖 寧, 谷山茂人, 石原 光, 他: 養殖ブリのヤケ肉発生に伴う普通筋の微細構造と細胞化学的 Mg^{2+} -ATPase 活性の変化. 日本食品化学学会誌, **16**: 137-142. 2009.
14. Cao M.J., Jiang X.J., Zhong H.C., *et al.*: Degradation of myofibrillar proteins by a myofibril-bound serine proteinase in the skeletal muscle of crucian carp (*Carassius auratus*). *Food Chem.*, **94**: 7-13. 2006.
15. Cao M.J., Hara K., Osatomi K., *et al.*: Myofibril-bound serine proteinase (MBP) and its degradation of myofibrillar proteins. *J. Food Sci.*, **64**: 644-647. 1999.
16. Bruce A., Dennis B., Julian L., *et al.*: Molecular Biology of The Cell Third Edition, Tokyo, Kyoikusha, 854-855, 1995.
17. Tachibana, K., Mishima, T., Tsuchimoto, M.: Changes of ultrastructure of cytochemical Mg^{2+} ATPase activity in ordinary muscle of cultured and wild red sea bream during storage in ice. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **59**: 721-727. 1993.
18. 橘 勝康, 鈴木秀一, 八木基明, 他: 養殖マダイの氷蔵中における普通筋中 α -アクチニンの限定分解. 日本水産学会誌, **67**: 723-727. 2001.

*: Corresponding author

1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki 852-8521, Japan

TEL: +81-95-819-2842

Email: tshigeto@nagasaki-u.ac.jp

大豆加工素材の添加が食パンの膨化 および嗜好性に及ぼす影響

The effect of the addition of processed soybean ingredients
on the swelling and palatability of bread

平尾 和子 (HIRAO Kazuko)^{1,*} 三星 沙織 (MITSUBOSHI Saori)¹ 古谷 彰子 (FURUTANI Akiko)^{1,2}
中塚 康雄 (NAKATSUKA Yasuo)³ 米山 陽子 (YONEYAMA Yoko)¹

¹ 愛国学院短期大学, ² 早稲田大学, ³ アンリエット

Key Words : 大豆加工素材 食パン 膨化 比容積 物性 官能評価 トレハロース

The effect of the addition of processed soybean ingredients on the swelling and
palatability of bread

Kazuko Hirao^{1,*} Saori Mitsuboshi¹ Akiko Furutani^{1,2} Yasuo Nakatsuka³ Yoko Yoneyama¹

¹ Aikoku Gakuen Junior College

² Waseda University

³ Henriette

[Key words:processed soybean ingredient, bread, swelling, specific volume, physical properties,
sensory evaluation, trehalose]

Abstract

Processed soybean ingredient is rich in protein, fat and dietary fiber and is gaining attention due to its physiological effects. The aim of this study was to examine methods for making palatable bread that swells well using a method that would be easy to replicate in the home. 4 types of processed soybean ingredients were tested as potential substitutes for 20% of the flour. The effect of replacing part of soft sugar with trehalose was also examined. Results showed that, bread containing processed soybean ingredients had increased swelling due to higher water content and gained in softness and moistness. Water amount added relative to the amount of processed soybean ingredient was as follows; soybean powder: 80~85%, defatted soybean powder: 85~90%, roasted soybean flour: 80~85% and okara powder made of soybean curd: 100%. If more than 100% was added for okara powder then an adverse effect on the specific volume was found. In the sensory evaluation, soybean powder bread was preferred equally to the control, followed by defatted soybean powder. 10% addition of sugar led to a hard crust with a strong burnt color, but if 30% or 50% of the sugar was substituted with trehalose the color of the crust was more favorable and palatable, water retention increased and hardness became moderate. Defatted soybean powder bread with trehalose substituted by 30% produced favorable bread in terms of color and ease of swallowing that was significantly preferred in general evaluation parameters.

1. 緒言

主食としての食パンは、炭水化物が摂取でき、エネルギー源となる。タンパク質や脂質、食物繊維などの栄養成分を食パンに添加できれば、主食自体の栄養バランスが向上し、素材によっては生理的効果も期待できるようになる。

これまで大豆素材を添加したパン¹⁾、乾燥オカラを添加したパン²⁾などの研究があるが、いずれも添加または置換する素材の使用は10%までである。大豆加工素材以外でもサツマイモ葉乾燥粉末を添加したパン³⁾の研究では、添加物は無水物換算で2%置換しているなど比較的使用量は少ない。筆者らも全粒粉小麦粉⁴⁾や大麦粉、雑穀類、分離大豆タンパク質⁵⁾などを強力粉と置換し、家庭での調製が容易でおいしい食パンの調製法を検討してきた。これらは、素材によってタンパク質、食物繊維およびビタミン、ミネラルが豊富で、その生理効果も期待されているが、置換量が多くなるとパンの膨化や食味・食感がやや劣る。そのため、健康改善意識が強い時は積極的に喫食されるかもしれないが、多少でも症状の改善がみられた後は日常的に継続して喫食するのは難しい。主食として毎日摂取するためには、膨化や食味・食感、経済性に優れ、入手が簡単で、栄養的、生理的にも優れているものが理想である。

大豆加工素材の置換量と機能性については、中塚ら⁶⁾が強力小麦粉（以下、強力粉とする）

の20%を大豆粉やおから粉、脱脂大豆粉で置換した食パンを用いて60歳代の男女1名ずつ（空腹時血糖値：正常，HbA1c:6.0程度）の食後血糖値の推移から検討している。強力粉100%食パンの摂食量56gと同量の大豆加工品20%置換パンを摂食したところ、大豆加工品を20%置換したパンは強力粉100%食パンの血糖値(IAUC 0-180)の1/2～2/3程度と低位を示し、食後血糖抑制効果の可能性があることが示唆されたと報告している。

また、これまでの研究^{1,2)}のように、最初にグルテン形成させたドウを作り、その後大豆加工品を水と共に添加すると多くのグルテン構造を破壊せずに捏ねられるため、パンの膨化がよい状態になるとされている。しかし、家庭でより簡単に食パンを調製するために家庭用自動ホームベーカリーを用いて行う場合には、時間差をつけて材料を投入することは手間のかかる作業であるため、あらかじめ内釜に材料をすべて入れた場合の検討が必要である。

そこで本研究では、4種の大豆加工素材を強力粉の20%置換し、膨化がよく嗜好性の高い食パンを家庭で簡単に調製する方法を検討した。

2. 材料および調製方法

2-1. 実験材料

大豆加工素材は、大豆粉（みたけ食品工業(株)）、きな粉（みたけ食品工業(株)）おから粉（キッ

表1 食パンの配合割合

	重量 (g)		
	コントロール	大豆加工素材 20%置換	ベーカース%
強力粉	250	200	100.0
大豆加工素材	—	50	20.0
上白糖		25.0	10.0
食塩		5.0	2.0
スキムミルク		4.8	1.9
ドライイースト		3.1	1.3
食塩不使用バター		25.0	10.0
蒸留水		150～250	60～100

*トレハロースを添加する場合は、上白糖の30% (7.5g) または50% (12.5g) を置換

*加水量の検討では、蒸留水を60% (150g) ～100% (250g) の間で添加

コーマンソイフーズ(株) および脱脂大豆粉(米国 ADM 社) の計 4 種を用いた。その他に、強力粉(日清製粉(株))、ドライイースト(日清フーズ(株))、上白糖(株)パールエース)、トレハロース(株)林原)、食塩(日本たばこ産業(株))、スキムミルク(雪印メグミルク(株)) および食塩不使用バター(雪印乳業(株))、蒸留水を用いた。食パンの配合割合を表 1 に示した。大豆加工素材を用いる場合は強力粉の 20% 置換とした⁶⁾。加水量は粉に対して 60% (150g) ~100% (250g) の間とし、蒸留水を添加した。

上白糖をトレハロースで置換する場合は、上白糖の 30% または 50% とした。

2-2. 食パンの調製方法

既報⁴⁾ に準じて、自動ホームベーカリー(Panasonic: SD-BM103) を用い、すべての材料をあらかじめ内釜に入れて食パンコースで調製した。使用した食パンコースは、捏ね 20 分間、ねかし 35 分間、捏ね 8 分間、発酵 137 分間および焼成 40 分間である。発酵は 52 分後および 92 分後に計 2 回のガス抜きが入り、最終発酵は 45 分間である。

2-3. 実験方法

(1) 粉類およびパンの水分含量

水分含量は加熱乾燥式水分計(株)エー・アンド・ディ:MX-50) を用いて、強力粉は 200°C で、各種大豆加工素材は 160°C で、5g ずつ 3 回測定した。食パンの水分は、焼成 1 日後のパンを、2cm 厚さに切り、中央の 1 枚から中央部と中央上部の表面に近い部分をそれぞれ 1g ずつ試料とし、160°C で 10 分間測定した。

(2) 平均粒径

粒度分布測定装置(株)島津製作所:SALD-3100) を用い、レーザー回折・散乱法(乾式)により平均粒径 D50 を求めた。

(3) 粉類の吸水率

試料 1g を遠心チューブに取り、蒸留水 30ml を入れて混ぜ、室温(24°C) で 5 分間浸漬後 3000rpm で 30 分間遠心分離した。上清を捨てた

残渣の重量から吸水量を求め、吸水前の試料重量に対する割合で吸水率を求めた。

(4) 色調

ハンディ型分光光度計(日本電色工業(株):NF333) を用い、焼成 1 日後の食パンの外相および内相の各 5 か所を測定し、L* 値、a* 値、b* 値をそれぞれ平均した。

(5) 比容積

焼成後 1 時間放冷した食パン重量を測定し、その後菜種法により食パンの体積を測定した。比容積はパンの体積をパン重量で除して求めた。

(6) 物性測定

パンは側面長径の中央から 2cm 厚さに切り(4 枚)、1 枚を 2cm 四方に切って、2×2×2cm の試料を切り出した。測定には内相部分のみを使用し、テンシプレッサー((有)タケトモ電機:My Boy II) を用いて、直径 30mm の円盤状プランジャーにより速度 1mm/秒、圧縮率 67% でテクスチャー測定を行った。1 試料につきおよそ 40 ~ 60 片測定し、測定値から硬さ、凝集性、弾力性を求めた。

(7) 実体顕微鏡による組織観察

焼成 1 日後の大豆加工素材または糖の種類を変えた食パンを試料とし、パンの中心部と上層部皮面付近の断面組織を実体顕微鏡(株)島津理化:STZ-171) にて倍率 10 倍で検鏡した。

(8) 官能評価

大豆加工素材または糖の種類を変えた食パンについて、焼成 1 日後の試料を用いて官能評価を行った。2cm 厚さに切った 1 枚を 6 等分し、同じ部位同士を組み合わせる試料とした。大豆加工素材食パンは 22 名、糖の種類を変えた食パンは 12 名の本学教職員をパネルとし、7 段階評点法で官能評価(特性評価、嗜好)を行い、自由記述の記入欄も設けた。

(9) 統計処理

統計解析は、エクセル統計 2006 を用いた。官能評価は二元配置分散分析を、その他は一元配置分散分析を行った。有意差検定は、Tukey 法の多重比較により解析した。

表2 強力粉および大豆加工素材4種の一般成分および平均粒径

種類	メーカー	水分 (%)	可食部 100g あたりの栄養成分							平均粒径 D50 (μm)
			エネルギー (kcal)	蛋白質 (g)	脂質 (g)	糖質 (g)	食物繊維 (g)	灰分 (g)	Na (mg)	
強力粉 (ミリオン)	日清製粉	14.4	366	12.2	1.5	68.8	2.7	0.4	0.1 ~ 0.5	96
大豆粉 (失活処理)	みたけ 食品工業	7.0	465	40	22	16	13	4.9	0	57
きな粉 (国産大豆)	みたけ 食品工業	4.4	437	36	23	14	17	5.1	1	150
おから粉 (粉末)	キッコーマン ソイフーズ	5.3	381	32	17	7	36	2	225	101
脱脂大豆粉 (Bakers)	ADM CO.	8.0	290	53	3.0	15	17	3	10	17

4. 結果

4-1. 各種大豆加工素材添加の影響

(1) 一般成分および平均粒径

表2に強力粉および大豆加工素材4種の一般成分および平均粒径を示した。水分および平均粒径以外の項目は、製品規格書から抜粋した。大豆加工素材はタンパク質、脂質、食物繊維および灰分に、それぞれ次のような特徴がある。大豆粉は大豆を煎って酵素活性を失活させたものでタンパク質、脂質が多く、きな粉も大豆を煎って粉砕しており、香りが強く、一般成分は大豆粉と似た値であった。おから粉は糖質が最も少なく、食物繊維が最も多く、ナトリウムが多い素材であった。脱脂大豆粉は大豆油を絞ったあとに粉砕しているため、タンパク質は4種の中で最も多く脂質は非常に少ない。平均粒径はきな粉が最も大きく、おから粉は強力粉とほぼ同じ平均粒径であり、脱脂大豆粉は最も平均粒径が小さかった。水分は強力粉が14%であるが、大豆加工素材は少なく、大豆粉および脱脂大豆粉が7.0~8.0%、きな粉およびおから粉は4.4~5.3%と違いがみられた。

(2) 各種大豆加工素材の吸水率

図1に強力粉と各種大豆加工素材の吸水率

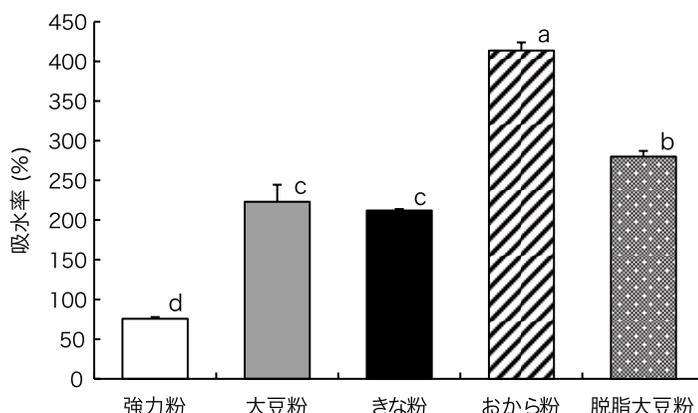


図1 強力粉および各種大豆加工素材の吸水率

を示した。おから粉は4種の大豆加工素材の中で有意に吸水率が高く、次いで脱脂大豆粉であった。大豆粉ときな粉は同程度の吸水率を示し、他の2種と比較すると有意に少なかった。

(3) 各種食パンの膨化状態および比容積

強力粉で調製する場合の適正加水量を決定するため、60、70、80および90%（ベーカーズ%、以下同様）と加水量を変えて調製したところ、形状および膨化が良かった加水量は60および70%であった。2点嗜好試験法の官能評価を行い（データ省略）、加水量60%を食パンのコントロールとした。同様に各種大豆加工素材を用いて加水量60%で調製したところ、いずれもコントロールに比べ膨化が低下した（図2）。特におから粉は膨化が小さく、内部のき

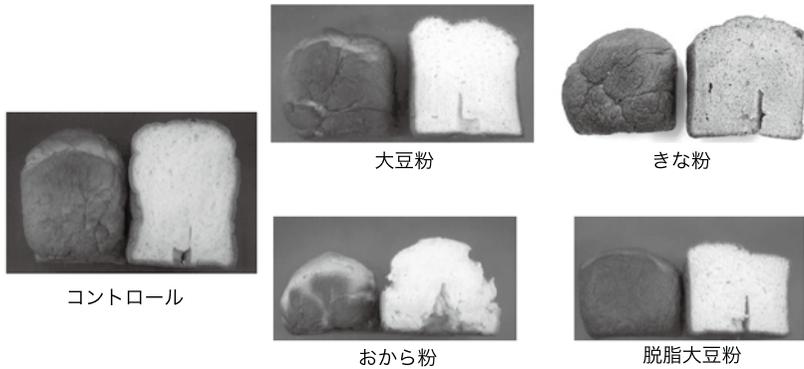


図2 各種食パンの膨化状態 (加水量 60%)

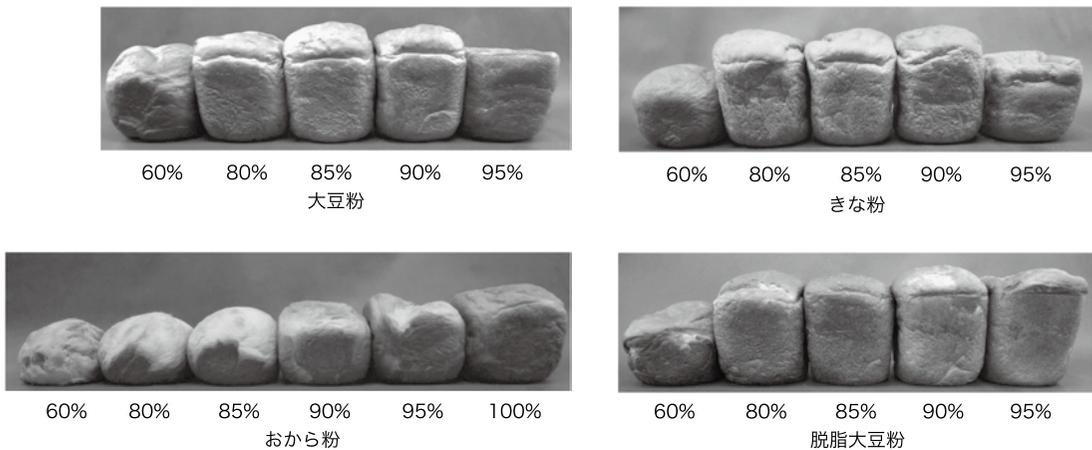


図3 加水量の異なる各種大豆加工素材食パンの膨化状態

めは細かく緻密で硬く、スポンジ構造とは異なっていた。次いで脱脂大豆粉、きな粉、大豆粉の順に膨化が大きかった。

20% 置換した大豆加工素材食パンは加水量 60% では膨化が小さかったため、加水量を増やして影響を検討した (図3)。また、図4には各種食パンの比容積を示したが、比容積は大豆粉が 70~85%、きな粉は 80~85%、おから粉が 100%、脱脂大豆粉は 85~90%の加水量の時に最も高い値を示した。おから粉については、100%以上 (105%, 110%, 115%および 120%) も調製したが、加水量 100%の

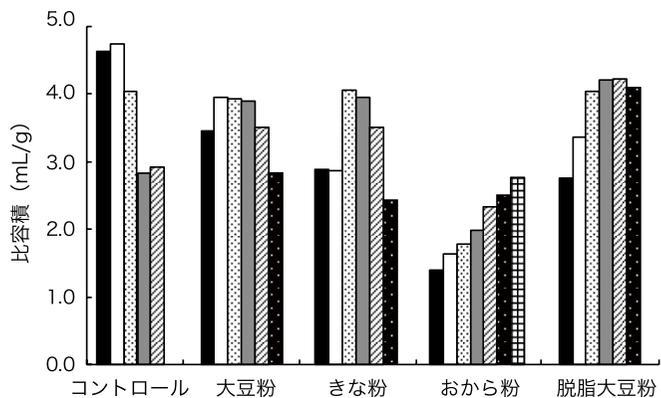


図4 加水量の異なる各種食パンの比容積
 加水量；■ 60% □ 70% ▨ 80% ▩ 85%
 ▪ 90% ▫ 95% ▧ 100%

パンの膨化状態および比容積が最も大きかった。

(4) 加水量が異なるパンの物性

図5に各種食パンの硬さ、凝集性および弾力性を示した。硬さでは、大豆粉ときな粉は加水量85%のパンが最も硬さが小さく、脱脂大豆粉では85%、90%、95%の値が小さかったが、80%と有意の差は認められなかった。おから粉では85%と100%の加水で最も小さい値であった。凝集性では、大豆粉は80~90%、き

な粉は85%、脱脂大豆粉は85~90%、おから粉は100%加水で値は大きくなった。弾力性ではコントロールでは70%が最も大きな値を示したが、大豆粉は60%、きな粉では80%、おから粉および脱脂大豆粉では85%が最も弾力性が大となった。

(5) 各種食パンの実体顕微鏡像

各種食パンの中心部の組織を図6に示す。コントロールでは、気泡の形が均一で気泡と気泡の間の膜が薄かった。しかし、各種大豆加工素材添加食パンでは、気泡の大きさや形が不均一で、気泡の周りの膜が厚く確認された。特におから粉では気泡の周りの膜が最も厚く、ガスが保持できずに気泡が崩れている部分もみられ、他の大豆加工素材食パンとは異なった内相構造が観察された。

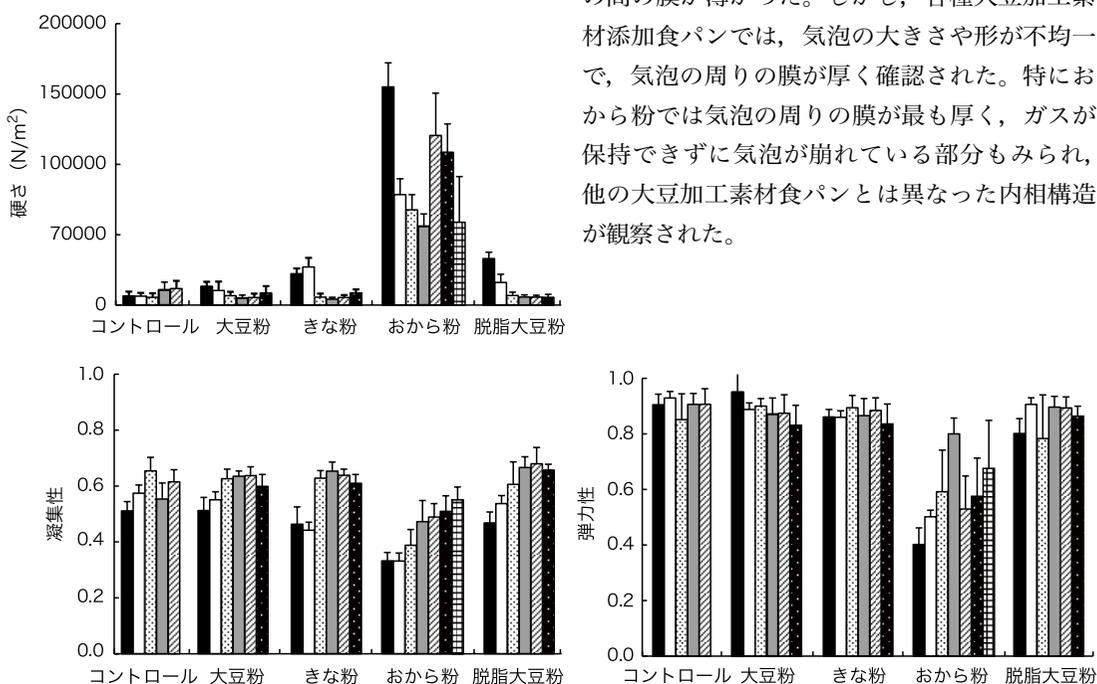


図5 各種食パンの物性

加水量；■ 60% □ 70% ▨ 80% ■ 85% ▩ 90% ● 95% ▤ 100%

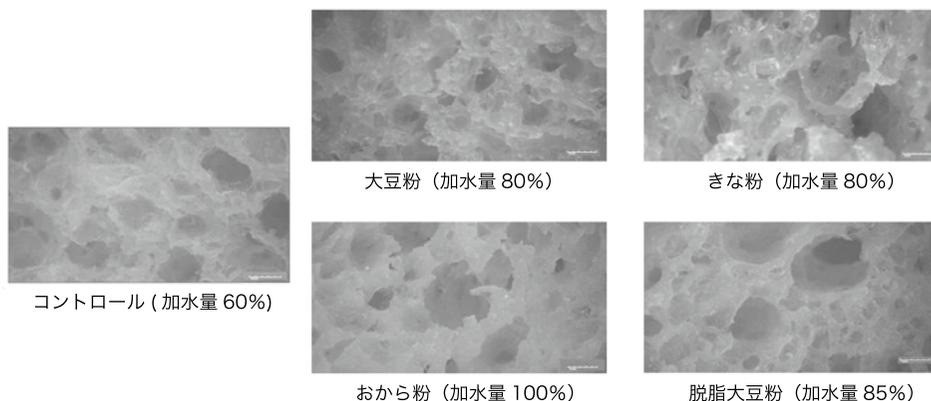


図6 各種食パンの実体顕微鏡像 (× 10)

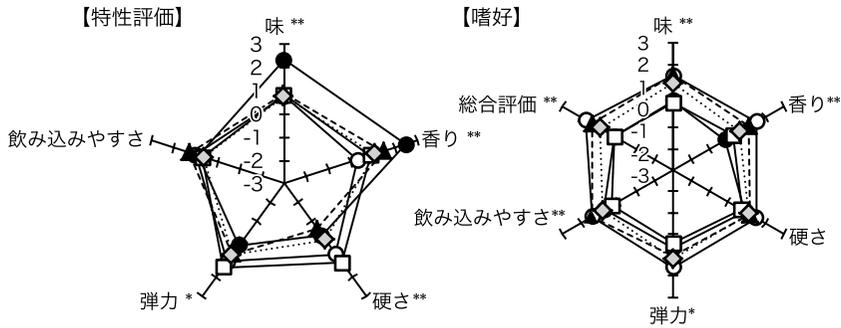


図7 各種食パンの官能評価
 —○—コントロール (60%) ---▲---大豆粉 (80%) ●きな粉 (80%)
 —□—おから粉 (100%) ◆脱脂大豆粉 (85%)
 () 内は加水量を示す; n=22; *, p<0.05; **, p<0.01

(6) 異なる大豆加工素材食パンの官能評価

物性測定においてコントロールの硬さと近似した値であった大豆加工素材4種の食パンおよびコントロールを用いて官能評価を行った(図7)。用いた4種とは、大豆粉およびきな粉は加水量80%、脱脂大豆粉は加水量85%、おから粉は硬さが小さく膨化がよかった加水量100%の食パンである。特性評価では、味、香り、硬さおよび弾力の項目、嗜好では、味、香り、弾力、飲み込みやすさおよび総合評価の項目に有意の差が認められた。試料ごとに比較をすると、大豆粉置換食パンは、特性評価ではコントロールよりも香りがあり(p<0.01)、コントロールおよびおから粉よりも硬さが低い(p<0.05)と評価され、嗜好ではきな粉よりも味、香り、総合評価の項目で好まれ(p<0.01)、飲み込みやすさの項目ではおから粉よりも好まれた(p<0.01)。脱脂大豆粉置換パンでは、特性評価においてきな粉よりも味および香りがなく、おから粉よりも硬さが低いと評価された(p<0.01)が、他の項目および嗜好では有意の差はなく、コントロールや大豆粉に次いで好まれる傾向があった。きな粉は特性評価の味、香りの項目で他の4種よりも有意にある(p<0.01)と評価されており、嗜好では味、香り、総合評価の項目でコントロールおよび大豆粉よりも有意に好まれなかった(p<0.01)。おから粉は、特性評価では大豆粉、きな粉、脱脂大豆粉よりも硬さが

ある(p<0.01)と評価され、嗜好では、味、香り、弾力、飲み込みやすさおよび総合評価でコントロールよりも有意に好まれず、大豆粉よりも味、総合評価の項目で好まれないと評価された。

4-2. 異なる糖を用いた食パン

各種大豆加工素材に置換した食パンは、クラストの焼き色が濃く硬くなったことから、10%添加していた上白糖の30%あるいは50%をトレハロースで置換して検討した(表1)。なお、4種の中でも焼き色が濃くなった大豆粉および脱脂大豆粉の2種で検討した。

(1) 異なる糖を用いた食パンの膨化状態と色調

図8に、上白糖の一部をトレハロースに置

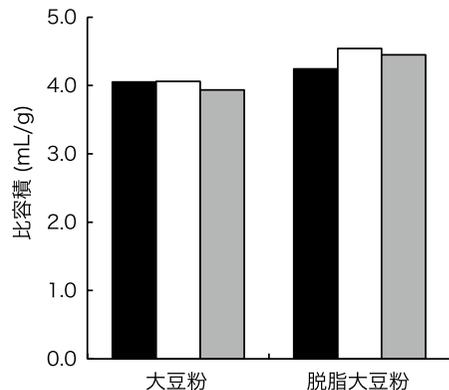


図8 異なる糖を用いた大豆加工素材食パンの比容積
 ■上白糖 10% □トレハロース 30% 置換
 ■トレハロース 50% 置換

換した大豆粉および脱脂大豆粉 20% 置換食パンの比容積を示した。さらに、表面及び内部の色調を測定した（データ省略）。トレハロース置換による膨化状態に違いは認められず、いずれの大豆加工素材においても上白糖のみとトレハロース 30% 置換および 50% 置換の比容積に有意の差は認められなかった。外観および色調から、トレハロースに置換したものは、表面の焼き色が薄くなり、明度 L^* 値の上昇がみられ、上白糖の 30% 置換で十分に効果が認められた。

(2) 異なる糖を用いた食パンの物性

図 9 に上白糖の一部をトレハロースで置換した食パンの硬さ、凝集性および弾力性を示した。いずれの項目もコントロールと有意の差は認められなかったが、トレハロースで置換したパンはコントロールに比べて、硬さは小さい値

を示し、軟らかくなった。

(3) 異なる糖を用いた食パンの実体顕微鏡像

トレハロース置換した大豆粉および脱脂大豆粉置換食パンの中心部とクラスト近くの組織を観察した（図 10）。いずれの大豆加工素材においても、上白糖のみを使用した場合はクラスト部分の焼き色が濃く、表面の組織が密接しているように観察された。しかし、上白糖の一部をトレハロース置換することにより、いずれのパンも、クラスト部分の色が薄くなり、組織も密着していない状態が観察された。

(4) 異なる糖を用いた食パンの官能評価

図 11 に脱脂大豆粉のトレハロース置換食パンの官能評価結果を示した。特性評価では皮の色の項目で、トレハロース添加した 2 種が上白糖 10% 添加に比べて有意に低く評価された

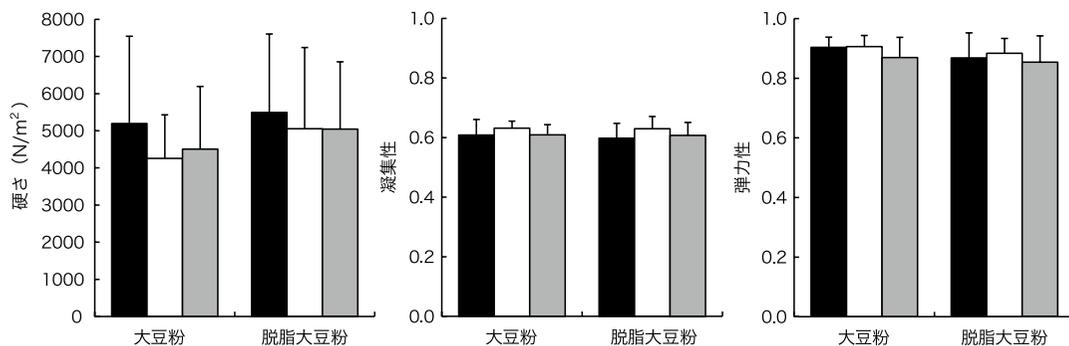


図 9 異なる糖を用いた食パンの物性値

■上白糖 10% □トレハロース 30% 置換 ▨トレハロース 50% 置換

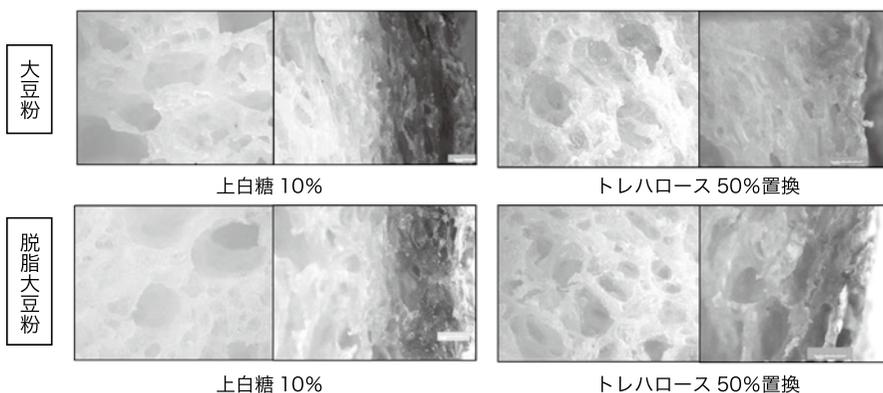


図 10 異なる糖を用いた大豆加工素材食パンの実体顕微鏡像
左、中心部；右、表面付近

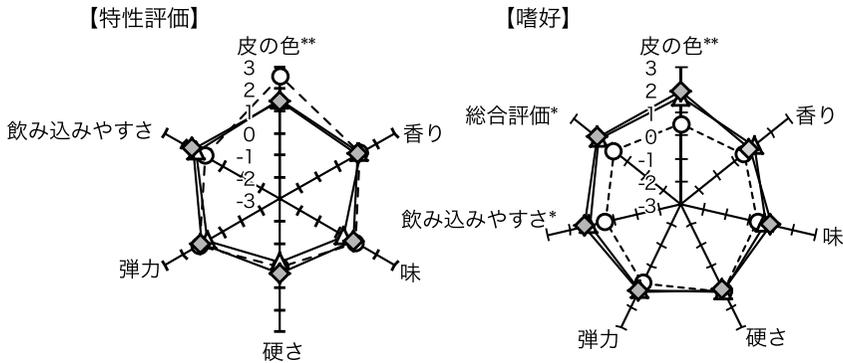


図 11 トレハロース置換量の異なる脱脂大豆粉 20% 置換食パンの官能評価
 ○—上白糖 10% △—トレハロース 30% 置換 ◇—トレハロース 50% 置換
 n=12; *, $p<0.05$; **, $p<0.01$

($p<0.01$)。嗜好では、皮の色および総合評価の項目において、トレハロース添加した 2 種が上白糖 10% 添加に比べ、1% または 5% の危険率で有意に高く評価された。また、嗜好の飲み込みやすさの項目ではトレハロース 50% 置換したパンは上白糖のみを用いたものに比べて有意に高く評価された ($p<0.05$)。図には示さなかったが、大豆粉パンの官能評価では、大豆粉の皮の色と弾力、嗜好では皮の色の項目に有意の差が認められた。トレハロース 50% 置換のパンは特性評価では、皮の色が有意にないと言われ、嗜好で有意に好まれた。

5. 考察

本報では、主食となる食パンに大豆加工素材を使用することで、日常的にタンパク質や食物繊維の摂取量を増加させることができるのではないかと考え、できるだけ簡単に継続可能な調製法を用いて、膨化や食味・食感のよい食パンを検討した。

近年高齢化が急速に進み、内閣府の平成 30 年版高齢社会白書によると、平成 29 年 10 月 1 日現在で高齢化率は 27.7% に達し、超高齢社会になっている。また、厚生労働省の平成 29 年国民健康・栄養調査では、目標とする BMI の範囲 (70 歳以上で $21.5 \sim 24.9 \text{kg/m}^2$) を下回る割合は、男性では 70 歳代で約 22%、80 歳以上では約 26%、女性では 70 歳代で約 36%、80

歳以上で 38.7% になると報告されており、高齢者の低栄養、栄養欠乏が懸念されている。葛谷⁷⁾によれば、高齢者の低栄養は筋肉量の減少や虚弱が引き起こされると報告しており、健康寿命の延伸や介護予防は困難になり、75 歳以上の後期高齢者が要介護状態になる原因の一つになっていると考えられる。高齢者は健康維持のための必要十分なタンパク質摂取がされていないという報告もある⁸⁾。一方、糖尿病などの生活習慣病も増加傾向にあり、年齢に合った栄養バランスの取れた食事が日常的に必要である。本報の大豆粉および脱脂大豆粉置換した食パンは、加水量を調整することで、官能評価の総合評価においてコントロールと有意な差は見られなかったことから、日常摂取できる可能性があると考えられる。今回は高齢者を対象とした官能評価は行っていないため、今後検討する必要がある。

当初すべての食パンをコントロールと同様に加水量 60% としたが、大豆加工素材を 20% 添加したものについては、コントロールに比べ膨化しなかった。これは、素材の吸水率の違いによるもの (図 1) と考えられ、特におから粉では、タンパク質と食物繊維の合計量が最も多く、置換量が 20% 程度であっても、パンの骨格となる澱粉に吸水される前にタンパク質や食物繊維に吸水されてしまったためと考えられ、これらの成分が多い場合、素材自体が必要とする吸

水量を知り、その分を加えることがパンを膨化させるには必要であると考え。しかし、闇雲に水分を加えれば良いものではなく、物性測定をし、軟らかく、弾力のある物性をもつ加水量を把握することが必要である。物性の硬さや弾力性の値は内部の組織に影響し、気泡の大きさや均一性、また気泡周囲の膜の厚さや状態などが、パンの食味、食感によるおいしさ、すなわち嗜好性に大きく影響を与えると考えられるので、物性測定に加え、顕微鏡観察も併用して確認した方が良いと考える。

強力粉の一部を大豆加工素材に置換することで、グルテン量が減少し、硬さ、凝集性、弾力性が低下すると考えられたが、タンパク質や食物繊維がそれを補うように気泡の周囲の膜として存在し、弾力性に影響を与えていると推察された^{3,9)}。鈴野ら³⁾は食物繊維素材を用いると気泡壁が食物繊維により厚い膜状のもので覆われると報告している。今回用いたおから粉は食物繊維に富んでいたが、おから粉置換食パン組織の気泡の周りの膜が厚く観察されたことは、食物繊維による影響が考えられる。また、新原¹⁰⁾は、タンパク質と脂質がパンのテクスチャーに及ぼす影響を細かく検討している。この中でパンの比容積、物性の硬さ、凝集性には、小麦粉の脂質の効果と脂質とタンパク質含量の相互作用が有意に関わっているとしている。また、凝集性については、脂質はグルテンに対して凝集性を高める方向、澱粉に対しては凝集性を低下させる方向に作用するとしている。

大豆粉置換パンでは、適度な加水をしたパンでは軟らかさを増し、コントロールと同様に有意に好まれた。きな粉置換のパンは膨化がよく、コントロールや大豆粉に近い組織構造であったが、官能評価の特性評価では他のパンよりも味、香りがかかなりあると評価され、嗜好では有意に好まれなかった。きな粉の嗜好性を上げるためには焙煎度の異なるきな粉や様々な糖類を用いて風味を改善する必要性があり、検討したいと考えている。脱脂大豆粉はタンパク質が多いが脂質は少なく、膨化や嗜好性については大

豆粉に次いで好まれる傾向を示したが、有意の差は認められなかった。脱脂大豆粉の嗜好性を増すためには、脂質の添加も考えられるが、脱脂大豆粉はタンパク質が多く脂質が少ないことが利点と考えられるので、他の方法を用いて嗜好性がさらに向上するように検討する必要がある。また、おから粉置換では粉に対して100%以上の加水も試みたが膨化率は低下し、加水量が110%を超えるとドウの組織を形成することもできなかった。おから粉は脂質が少なく食物繊維が多いため、加水量以外の検討をすることが膨化を向上させるためには必要であり、今後の検討課題としたい。

以上のことから、膨化が良く、硬さが少なく、弾力性のある食パンの生地を作るためには、大豆粉は80~85%、きなこでは80~85%、おから粉は現状では100%、脱脂大豆粉では85~90%の加水量が必要であろう。値に幅を持たせたのは、各企業で扱っている大豆加工素材は一般成分や平均粒径などが異なるため、どの素材で調製してもこの範囲を目安にして微調整することにより、膨化の良いパンを得ることができると考える。このように大豆加工素材を用いた食パンは、適正加水量を用いることで組織がコントロールに近くなり、膨化が向上し、軟らかさやしっとり感が付与されると考える。

一方、糖類については、上白糖10%添加では焼き色が強くクラストが硬くなったために検討を行ったが、上白糖の一部をトレハロース置換することで焼き色が抑えられクラストの硬さも適度な状態を示し、嗜好性が向上した。トレハロース置換により、アミノカルボニル反応が抑えられたこととトレハロースの保水性によるものと推察した。脱脂大豆粉では30%置換で保水性をもち、しっとり感のある、しかも焼き色の適度な食パン焼成できると考えた。トレハロースは上白糖に比べイーストの栄養源にはならないため、トレハロース置換では膨化の点で劣るのではないかと考えていたが、上白糖のみで調製した食パンと膨化や物性に有意差は認められなかった。ただし、脱脂大豆粉はトレハロー

ス 30% 置換で効果が見られたが、大豆粉は脂質の量が多いためか、トレハロースが 50% 置換でなければその効果がみられず、大豆加工素材の一般成分の違いにより置換量を考慮した方がよいと考える。官能評価の自由記述の中には、トレハロース置換したものは、大豆特有のにおいが少なく、甘さが少ない、香りがよい、クラムのきめが細かいなどがあり、評点による評価値には反映できない利点も書かれていた。今後は他の糖類についても検討していきたい。

なお、本研究は平成 30 年 8 月 30～31 日に武庫川女子大学で開催された一般社団法人日本調理科学会平成 30 年度大会において発表した内容である。

6. 要約

タンパク質、脂質および食物繊維に富み、多くの生理効果が期待されている大豆加工素材 4 種を強力粉の 20% 置換し、その比容積、物性

および官能評価から、膨化がよく嗜好性の高い大豆加工素材食パンを家庭で簡単に調製する方法を検討した。また、上白糖の一部をトレハロースで置換した効果についても検討を行った。

大豆加工素材を用いた食パンは、いずれも加水量の増加により膨化が向上し、軟らかさやしっとり感が付与された。その加水量は、大豆粉置換では 80～85%、きな粉では 80～85%、おから粉では 100%、脱脂大豆粉置換では 85～90% であった。おから粉は 100% 以上の加水では逆に比容積は低下した。官能評価では、大豆粉置換ではコントロールと同様に好まれ、次いで脱脂大豆粉置換であった。糖類は、砂糖 10% 添加では焼き色が強くクラストが硬くなったが、その 30% あるいは 50% をトレハロース置換することでクラストの焼き色が抑えられ嗜好性が向上するとともに、保水性が増加して硬さも適度となった。特に脱脂大豆粉のトレハロース 30% 置換では、皮の色、飲み込みやすさおよび総合評価の項目で有意に好まれた。

文 献

1. 大羽和子, 中野淳子: 大豆素材添加食パンの製パン性, 物性および食味評価, 日本家政学会誌 **47**(1): 21-27, 1996
2. 堀内理恵, 伊藤みどり, 杉原好枝, 福田満: 乾燥オカラが食パンの比容積に与える影響, 日本食生活学会誌 **16**(1): 31-38, 2005
3. 鈴野弘子, 石田裕, 印南敏, 前川昭男, 田所忠弘: サツマイモ葉凍結乾燥粉末配合パンの製パン性と品質, 日本食生活学会誌 **15**(1): 29-34, 2004
4. 平尾和子, 米山陽子, 佐藤清香, 三星沙織, 廣瀬理恵子, 藤谷朝美: 全粒小麦粉を用いた食パンに及ぼす添加材料の影響, 日本応用糖質科学会平成 26 年度大会講演要旨集: **36**, 2014
5. 町田優子, 平尾和子, 斎尾恭子: 加水量の違いによる分離大豆たんぱく添加パンの改善効果, 愛国学園短期大学紀要 **29**: 35-43, 2012
6. 中塚 康雄, 中塚 実知代: 食物繊維やミネラルが豊富な低糖質パンの最適材料設計指針に関する一考察, 第 17 回日本 GI 研究会要旨集: 12-14, 2018
7. 葛谷雅文: 超高齢社会における虚弱の評価と介入の重要性 医事新報, **4599**: 27-31, 2012
8. Kerstetter JE, O'Brien KO, Insogna KL.: Low protein intake: the impact on calcium and bone homeostasis in humans. *J Nutr.* **133**: 855S-861S, 2003.
9. 高橋真美, 森高初恵: パンの組織と色調に及ぼす紅麴の影響, 日本調理科学会誌 **42**(4): 225-237, 2009
10. 新原立子: タンパク質の異なるパンのテクスチャーに対する脂質の影響, 日本家政学会誌 **45**(10): 891-898, 1994

*: Corresponding author

Kazuko Hirao

Aikoku Gakuen Junior College

5-7-1 Nishikoiwa Edogawaku Tokyo 135-8585, Japan

TEL: +81-3-3658-4111 Email: hirao@aikoku-jc.ac.jp

高尿酸血症を抑制するファイトケミカル素材

Phytochemicals with Anti-hyperuricemic Potential: Studies in Cultured Hepatocytes and Purine Bodies-Induced Hyperuricemic Model Mice

矢ヶ崎 一三 (YAGASAKI Kazumi)* 安達 真一 (ADACHI Shin-ichi)*

* 宇都宮大学バイオサイエンス教育研究センター

Key Words : 高尿酸血症 インスリン抵抗性 ファイトケミカル ケルセチン ルチン 肝細胞

Phytochemicals with Anti-hyperuricemic Potential: Studies in Cultured Hepatocytes and Purine Bodies-Induced Hyperuricemic Model Mice

Kazumi Yagasaki[†] and Shin-ichi Adachi[†]

[†] Center for Bioscience Research and Education, Utsunomiya University

[Key words: Hyperuricemia, Insulin resistance, Phytochemicals, Quercetin, Rutin, Hepatocyte]

Abstract

Hyperuricemia is the high blood uric acid (UA) state and results from the UA overproduction in the liver and/or its underexcretion from the kidney. Hyperuricemia is the primary cause for gout. Hyperuricemia is reported to be associated with metabolic syndrome and insulin resistance. We have contrived a new assay system for UA production *in vitro* employing cultured AML12 hepatocytes and *in vivo* administering UA precursors to mice (purine bodies-induced hyperuricemic model mice). Phytochemicals that suppressed UA production in cultured hepatocytes were then examined their effects in hyperuricemic model mice. Quercetin has already been shown to be hypouricemic in typical assay systems, i.e., xanthine oxidase (XO) inhibition assay *in vitro* and potassium oxonate (PO)-induced hyperuricemic animal models *in vivo*. Quercetin as well as allopurinol, a well-known XO inhibitor, was shown to suppress both the UA production in AML12 hepatocytes *in vitro* and purine bodies-induced hyperuricemia *in vivo*, demonstrating that newly contrived assay systems in combination work correctly. So far, we have found several anti-hyperuricemic phytochemicals such as quercetin and its analogue, dihydroquercetin/taxifolin. Dihydroquercetin has been found to possess hypouricemic actions both in cultured hepatocytes and in mice with purine bodies-induced hyperuricemia, although its anti-hyperuricemic effect has been overlooked thus far. These results indicate that novel anti-hyperuricemic phytochemicals still exist in foods and edible natural resources.

はじめに

血清中の尿酸濃度（尿酸値）が7.0 mg/dL を越えると高尿酸血症と診断される。遺伝的な要因もあるが、生活習慣病の一つとされている。そして高尿酸血症は「風が吹いても痛い」痛風の主要原因として知られている¹⁻³⁾。高尿酸血症は、痛風に加えて高血圧、腎臓疾患そして代謝症候群の危険因子とも言われている⁴⁾。尿酸の前駆体となるプリン体を多く含む食品（肉類や魚介類・干物など）の摂り過ぎに注意が必要とされている⁵⁾。また、アルコール⁶⁾や果糖（fructose）⁷⁾の摂りすぎも高尿酸血症の発症と関係することが報告されている。近年、血中尿酸濃度とインスリン抵抗性との間に、正の相関があることがモデル動物⁸⁾やヒト⁹⁾で報告されている。この正の相関性は、上述した「高尿酸血症が代謝症候群とくに2型糖尿病の危険因子である」ことの一例と言える。

尿酸は肝臓のみならず、脂肪組織や筋肉でも合成されている⁶⁾が、肝臓が主要生産工場であるプリンヌクレオチド（purine nucleotides）である guanosine-5'-monophosphate (GMP)、inosine-5'-monophosphate (IMP) などから、各種酵素例えば 5'-nucleotidase, purine nucleoside phosphorylase, guanine deaminase, および xanthine oxidase (XO) の作用により最終的に xanthine となり、これに XO が作用して尿酸が産生される¹⁰⁾。すなわち XO は尿酸合成の鍵酵素と言

える。なお、げっ歯類においては、尿酸はウリカーゼ（uricase）という酵素によってアラントイン（allantoin）に分解され、体外へ排泄される。一方、ヒトや霊長類はウリカーゼ活性を欠いている。すなわち、ヒトにおいては尿酸がプリン代謝の最終産物である¹⁰⁾（図1）。

血中尿酸濃度は、主に肝臓での尿酸合成と腎臓からの尿酸排泄のバランスに依存している^{6, 10)}。尿酸合成抑制剤として、XO 阻害作用のあるアロプリノール（allopurinol）^{11, 12)}やフェブキソスタット（febuxostat）¹²⁾がヒトで処方されている。また、腎臓の近位尿細管にあり、尿酸再吸収を行う尿酸トランスポーター分子 URAT1 の阻害剤ベンズブロマロン（benzbromarone）は、尿中に排泄された尿酸の再吸収を抑制し、結果として血中の尿酸濃度低下作用を示し、ヒトに処方されている¹³⁾。

本稿では、主として尿酸合成阻害によって高尿酸血症を軽症化する植物化学物質（ファイトケミカル）、とくに安全性の観点から食品や被食歴のある天然物由来ファイトケミカルの作用について、筆者らの行った研究を含めて述べることとする。

1. *In Vitro* アッセイ系の構築

1-1. 従来からの *In Vitro* アッセイ系

従来、尿酸合成阻害作用物質探索の一次スクリーニング系は、尿酸合成の鍵酵素である XO

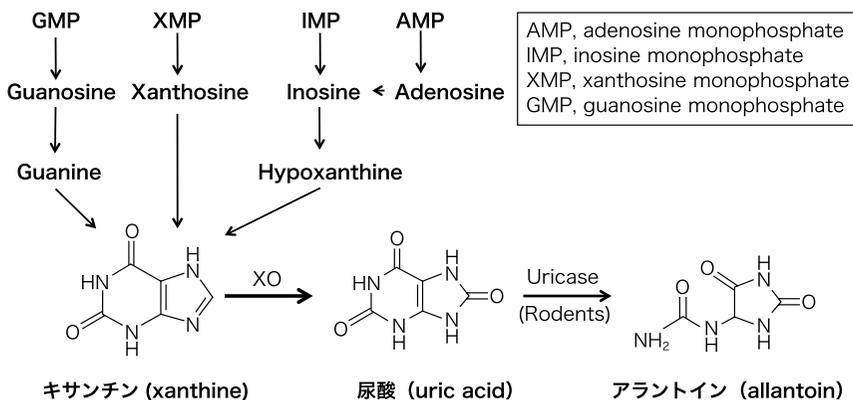


図1 ヌクレオチドリン酸（nucleotide monophosphates）からの尿酸形成と分解

（文献6, 10を参考に作成）

に直接被験物質を試験管内で作用させ、XO 活性の 50% 抑制濃度 (IC₅₀) が一定値以下 (例えば 100 μM 以下) の物質を選別した¹⁴⁻¹⁶⁾。このような *in vitro* 一次スクリーニング系で見出された候補物質は、*in vivo* 二次スクリーニングのため大きく貢献してきた^{16, 17)}。一方で、プリン代謝には多くの酵素が関与して多段階に渡るので XO 以外を標的とする候補物質や、IC₅₀ が基準値以上で一見作用が弱く見えても *in vivo* で有効である候補物質を見逃してしまう可能性、あるいは経口投与した際に消化管で代謝ないし吸収されない形の物質がスクリーニングされる可能性などが考えられる。

1-2. 新たに構築した *In Vitro* アッセイ系

筆者らは、これまでに培養細胞を用いた機能検定系の構築を複数行ってきた。その例として、まず培養肝癌細胞の例を述べる。正常細胞にはない癌細胞の二大特性として無限増殖性と転移性が挙げられる。癌転移の過程は多段階に渡るが、なかでも浸潤段階が特徴的かつ重要である。腹水肝癌 AH109A 細胞は純日本産の癌細胞で、細胞培養系でよく増殖し、呑龍系 (Donryu strain) ラットの腹腔内はもちろん、皮下移植でも増殖して固形癌を形成する。この AH109A の増殖能検定系および浸潤能検定系を構築し¹⁸⁾、*in vivo* モデル (肝癌移植ラット) も用いて、多くの栄養素・非栄養素の増殖・浸潤抑制作用とその機構を解析してきた¹⁹⁾。もう一つの例は、培養筋管細胞による簡便なグルコース取り込み能検定系を利用した抗糖尿病作用を有するファイトケミカルの探索系である²⁰⁾。この系で探索されたファイトケミカルを 2 型糖尿病モデルマウスへ投与して、有効性と作用機構を解析している²⁰⁻²³⁾。

そこで、細胞培養系を用いて、本題の高尿酸血症抑制作用を示すファイトケミカルの探索系を構築することとした。Petrie ら²⁴⁾ は、Wistar 系ラットから分離した初代培養肝細胞、ヒト肝癌由来 HepG2 株化細胞、マウス肝臓由来 AML12 株化細胞を培養し、尿酸産生能を比較

した。その結果、これらのうち HepG2 細胞は、用いた培養条件下では尿酸産生は認められなかったが、初代培養肝細胞と AML12 細胞は尿酸を産生した。前者の初代培養肝細胞ではウリカーゼ阻害作用を有するオキソンの影響を受け、尿酸産生量が上昇したが、後者の AML12 細胞はオキソンの影響を受けず、あたかもウリカーゼ活性を有しないヒト肝細胞様の応答を示した。そこで筆者らは、AML12 細胞を用いて各種条件検討を経て、*in vitro* での尿酸産生能検定系を構築した²⁵⁾。この AML12 肝細胞培養系では、特定の酵素等を標的とせず、尿酸合成の前駆体を培地に加え、肝細胞内で産生されて細胞外へ出てきた尿酸を測定して尿酸産生を評価するため、意外なものがスクリーニングされてくる可能性が期待できると考えている。

2. *In Vivo* アッセイ系の構築

上記 AML12 細胞を用いて尿酸産生を抑制するファイトケミカルは、次に *in vivo* 試験、すなわち高尿酸血症モデル動物 (マウス、ラット等) での二次スクリーニングの候補物質 (検体) となる。筆者らは、検体量 (費) 節約のためにマウスを使用している。

従来の高尿酸血症モデルは、尿酸をアラントインへと分解するウリカーゼ活性を有するげっ歯類 (rodents) のマウスやラット (図 1)、最近ではツパイ (キネズミ tree shrew)²⁶⁾ へ、ウリカーゼ阻害剤であるオキソン酸カリウム (potassium oxonate, PO) を腹腔内投与して作成する方法が一般的である。

筆者らは PO と異なり、食生活が高尿酸血症誘発に影響するような、食事誘導性高尿酸血症モデルを作れないかと考えた。肝細胞培養系では諸検討の結果尿酸前駆体として guanosine-inosine (GI mixture of nucleosides) を用いたので、マウスへも同様の GI mixture を動物へ投与するのが自然であるが、腹腔内投与用液 (リン酸緩衝液, PBS (-)) への溶解性の関係から GMP-IMP (GI mixture of nucleotides) を投与することとした。GMP と IMP はうま味成分であり

27), 日常では肉, 魚介類, シイタケなどから摂取しているのに, 経口投与ではないにしても食生活に関わるモデルとなりうると考えられたからである。なお, GMP と IMP を腹腔内投与しても体内で 5'-nucleotidase が働いて, 容易に GI mixture of nucleosides となるようで, 高尿酸血症は間違いなく発症する²⁵⁾。

上記の PO や GMP-IMP 投与によって発症する高尿酸血症は数時間以内の一過性モデルである。これに対し, 2 型糖尿病モデル KK-A^y/Ta マウスでは持続的な高尿酸血症が生じている可能性がある⁸⁾。

3. 高尿酸血症抑制作用を示すファイトケミカルの例

3.1. タマネギやソバに多いケルセチンと配糖体ルチンの作用について

新たに考案した上記 *in vitro* アッセイ系 (肝細胞培養系) と *in vivo* アッセイ系 (尿酸合成前駆体投与による高尿酸血症惹起モデル)²⁵⁾ で高尿酸血症抑制作用を示すファイトケミカルの検討を行った。これまでに *in vitro* および *in vivo* アッセイ系において, 有用性を示すファイトケミカルを複数見いだしているが, ここでは

その一部について紹介する。本稿で作用を述べる代表的物質および関連物質, 陽性対照として用いたアロプリノールの構造を図 2 に示した。

ケルセチン (quercetin) はフラボノールを骨格とする物質で, 配糖体 (ルチン, ケルシトリン) あるいは遊離した形 (アグリコンという) でタマネギやソバをはじめ多くの植物に含まれている。ケルセチンは, 従来のウリカーゼ阻害剤 (PO) 投与モデルマウスで血清尿酸濃度の上昇を抑制することが知られている¹⁷⁾。そこでアロプリノールを陽性対照 (positive control) として, まずはケルセチンの作用を検討した。

一次スクリーニングとして行った AML12 肝細胞実験の結果を示す。図 3a にはアロプリノールの用量 - 作用反応を, 図 3b にはケルセチンの用量 - 作用反応を示す。いずれも, 用量依存的かつ有意に培養肝細胞における尿酸産生量の低下が認められた。ただし, アロプリノール (薬品) の濃度はケルセチンの 100 分の 1 程度の濃度で, ケルセチン (食品由来) と同等の抑制作用を示すことに注意されたい。

次に, 二次スクリーニングとして, 尿酸合成前駆体 (GMP-IMP mixture) 投与による高尿酸血症モデルマウスにおけるアロプリノールとケ

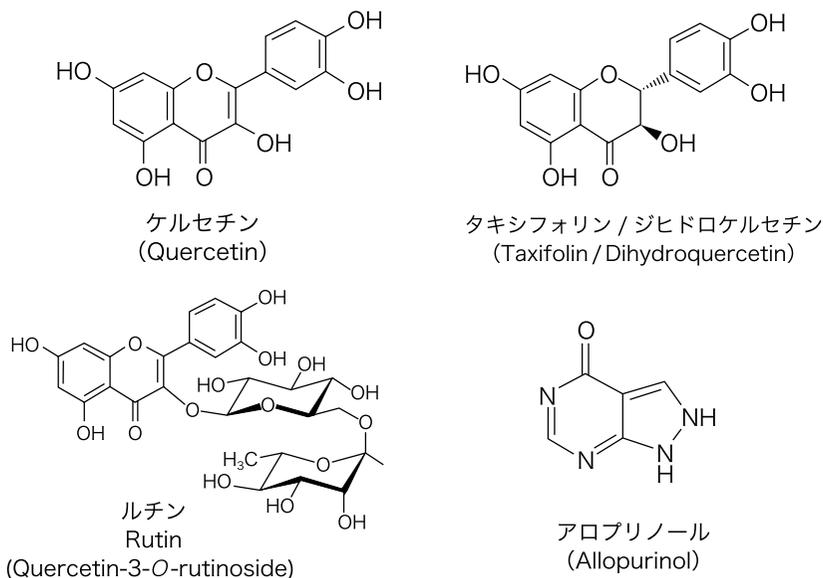


図 2 高尿酸血症を軽減化する食品由来ファイトケミカルとアロプリノールの構造

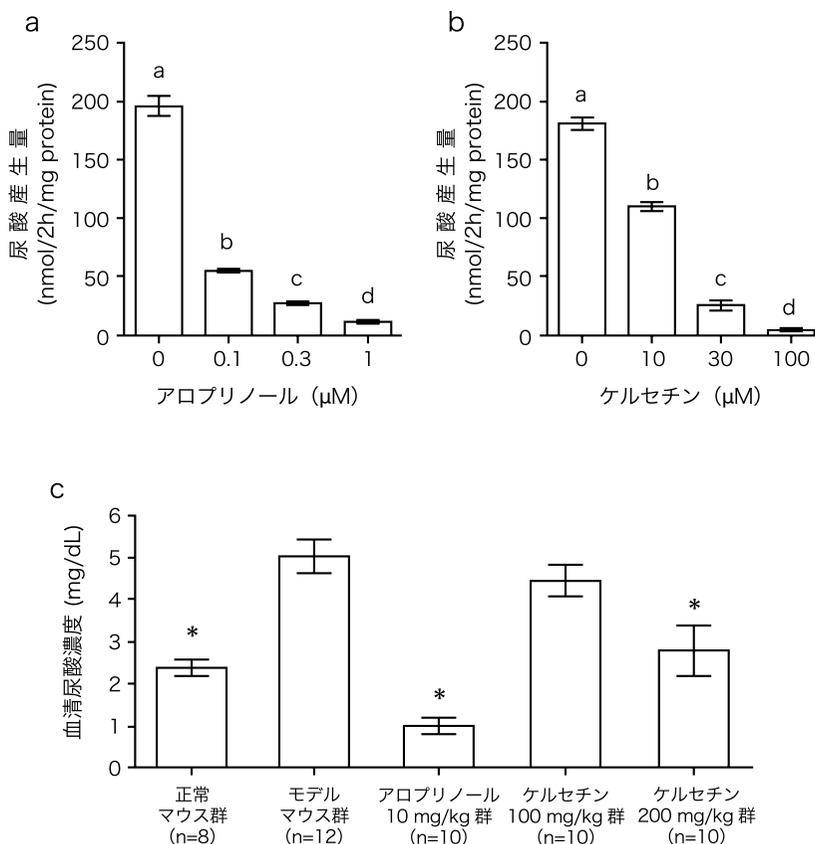


図3 培養肝細胞の尿酸産生量と血清尿酸濃度に対するアロプリノールとケルセチンの影響
結果は、平均値±標準誤差で示した。図3aと図3bの各濃度の検体数はn=6であり、異なるアルファベットのついた数値間には有意差のあることを示す。図3cの*は、モデルマウス群に対して有意差のあることを示している。(文献25を参考に作成した。)

ルセチン投与の結果を示す(図3c)。正常マウス群に比べてモデルマウス群では血清尿酸濃度が有意に上昇し、陽性対照として用いたアロプリノール(10 mg/kg)はこの上昇を有意に抑制し、この動物モデルが正しく作動していることを示した。そしてケルセチン(200 mg/kg)も、有意な血清尿酸濃度抑制作用を示すことが認められた。

ルチン(queretin-3-O-rutinoside)はケルセチンの配糖体で、ケルセチン(アグリコン)の3位炭素の水酸基とルチノースがC-O-C結合したものである。これをAML12肝細胞へ作用させると、ケルセチンそのものよりは高濃度を要するものの、尿酸産生を有意に抑制することが認められた。また、尿酸合成前駆体投与モデ

ルマウスにおいて発症した高尿酸血症は、ルチン投与により正常レベルにまで改善された²⁸⁾。配糖体においては、アグリコンと糖の結合様式がC-O-C結合の場合とC-C結合の場合で、培地内あるいは消化管内で糖部分の切断のされ方に差があるように見える。すなわち、アグリコンで有効であれば、配糖体でも有効であるとは限らない、と言えるかも知れない。今後の検討課題である。

3.2. 針葉樹やイチゴに含まれるケルセチン構造類似体タキシフォリンの作用について

ケルセチンと構造の類似しているタキシフォリン(taxifolin)またはジヒドロケルセチン(dihydroquercetin)に関しては、筆者らの知る限

りにおいては PO モデルで高尿酸血症を抑制するという報告はない。タキシフォリンは、シベリアカラマツ²⁹⁾ やイチイ³⁰⁾ といった針葉樹に見出されているが、イチゴにも含まれている³¹⁾。筆者らも、「とちおとめ」や「スカイベリー」という栽培型八倍体イチゴにも含まれることを見いだしている³²⁾。なお、ケルセチンとタキシフォリンは構造的に類似しているものの、変異原性 (mutagenicity) には差があり、タキシフォリンのほうが低いという報告がある³³⁾。

そこで、タキシフォリンについて *in vitro* および *in vivo* での尿酸代謝に対する影響を検討した³²⁾。AML12 細胞における尿酸産生は、タキシフォリンによって用量依存的かつ時間依存的に有意に抑制された (0 ~ 100 μ M; 2 または 4 時間)。そこで次に、尿酸前駆体誘導性高尿酸血症モデルマウスへタキシフォリン (100, 300 mg/kg) を経口投与したところ、300 mg/kg 投与量群で高尿酸血症は有意に抑制され、正常レベルにまで改善された。この時、肝臓の尿酸含量と XO 活性は、対照群に比べてタキシフォリン投与群で有意に抑制された。タキシフォリンは、個体レベルでケルセチンに匹敵する高尿

酸血症抑制作用を示した。

その他にも興味深いファイトケミカルが見出されつつある³⁴⁾ が、現在解析中のものについては、別の機会があればその際に述べることとする。

おわりに

筆者のひとり (KY) は 20 年ほど前に、ある国で開催された国際学会参加中に痛風となり、現地の病院で鎮痛剤を処方された。帰国後すぐにベンズプロマロンを処方され、尿酸値が正常化した経験がある。これが、いつの日か機会があったら、高尿酸血症を抑制する食品・天然物由来成分の研究を行いたい、しかもその最初の成果は発作を起こした国で開催される国際学会で発表したいと思うきっかけとなった。そしてその思いは 2015 年秋に達成され、現在に至っていることを付記したい。

謝辞

本研究の一部は、文部科学省地域イノベーション戦略支援プログラムおよび日本学術振興会科学研究費 (15K07424, 16K16273) の助成により行われたものである。この場をお借りして深謝申し上げます。

参考文献

1. Zhao X, Zhu JX, Mo SF, Pan Y, Kong LD.: Effects of cassia oil on serum and hepatic uric acid levels in oxonate-induced mice and xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activities in mouse liver. *J Ethnopharmacol.* **103** (3): 357-365, 2006.
2. Richette P, Bardin T.: Purine-rich foods: an innocent bystander of gout attacks? *Ann Rheum Dis.* **71**(9): 1435-1436, 2012.
3. Bardin T, Richette P.: Definition of hyperuricemia and gouty conditions. *Curr Opin Rheumatol.* **26**(2): 186-191, 2014.
4. Choi HK, Mount DB, Reginato AM.: Pathogenesis of gout. *Ann Intern Med.* **143**(7): 499-516, 2005.
5. Choi HK, Atkinson K, Karlson EW, Willett W, Curhan G.: Purine-rich foods, daily and protein intake, and the risk of gout in men. *N Engl J Med.* **350**(11): 1093-1103, 2004.
6. Lima WG, Martins-Santos ME, Chaves VE.: Uric acid as a modulator of glucose and lipid metabolism. *Biochimie.* **116**:17-23, 2015.
7. Khitan Z, Kim DH.: Fructose: a key factor in the development of metabolic syndrome and hypertension. *J Nutr Metab.* 2013: 682673. doi: 10.1155/2013/682673.
8. Adachi SI, Yoshizawa F, Yagasaki K.: Hyperuricemia in type 2 diabetic model KK-A^y/Ta mice: a potent animal model with positive correlation between insulin resistance and plasma high uric acid levels. *BMC Res Notes.* **10**(1): 577, 2017.
9. Avula NR, Shenoy D.: Evaluation of association of hyperuricaemia with metabolic syndrome and insulin resistance. *J Clin Diagn Res.* **10**(12): OC32-OC34, 2016.
10. Ishikawa T, Aw W, Kaneko K.: Metabolic interactions of purine derivatives with human ABC transporter ABCG2: genetic testing to assess gout risk. *Pharmaceuticals.* **6**(11): 1347-1360, 2013.
11. Ruggeri M, Basile M, Drago C, Rolli FR, Cicchetti A.: Cost-Effectiveness Analysis of Lesinurad/Allopurinol Versus Febuxostat for the Management of Gout/Hyperuricemia in Italy. *Pharmacoeconomics.* **36**(5): 625-636, 2018.
12. Frampton JE.: Febuxostat: a review of its use in the treatment of hyperuricaemia in patients with gout. *Drugs.* **75**(4): 427-438, 2015.
13. Kojima S, Kojima S, Hifumi A, Soejima H, Ogawa H.: Therapeutic strategy for efficient reduction of serum uric acid levels with allopurinol versus benzbromarone in hyperuricemic patients with essential hypertension - A randomized crossover study (terao study). *Int J Cardiol.* **224**: 437-439, 2016.
14. Noro T, Oda Y, Miyase T, Ueno A, Fukushima S.: Inhibitors of xanthine oxidase from the flowers and buds of *Daphne genkwa*. *Chem Pharm Bull.* **31**(11): 3984-3987, 1983.
15. Nguyen MT, Awale S, Tezuka Y, Tran QL, Watanabe H, Kadota S.: Xanthine oxidase inhibitory activity of Vietnamese medicinal plants. *Biol Pharm Bull.* **27**(9): 1414-1421, 2004.
16. Kondo M, Hirano Y, Nishio M, Furuya Y, Nakamura H, Watanabe T.: Xanthine oxidase inhibitory activity and hypouricemic effect of aspalathin from unfermented rooibos. *J Food Sci.* **78**(12): H1935-H1939, 2013.
17. Mo SF, Zhou F, Lv YZ, Hu QH, Zhang DM, Kong LD.: Hypouricemic action of selected flavonoids in mice: structure-activity relationships. *Biol Pharm Bull.* **30**(8): 1551-1556, 2007.
18. Miura Y, Shiomi H, Sakai F, Yagasaki K.: Assay systems for screening food components that have anti-proliferative and anti-invasive activity to rat ascites hepatoma cells: *in vitro* and *ex vivo* effects of green tea extract. *Cytotechnology.* **23**(1-3): 127-132, 1997.
19. 矢ヶ崎 一三:病態モデルによる食品因子の作用に関する栄養学的・食理学的研究. 日本栄養・食糧学会誌, **62**(2): 61-74, 2009.
20. Kawano A, Nakamura H, Hata S, Minakawa M, Miura Y, Yagasaki K.: Hypoglycemic effect of aspalathin, a rooibos tea component from *Aspalathus linearis*, in type 2 diabetic model db/db mice. *Phytomedicine.* **16**(5): 437-443, 2009.
21. Cheong SH, Furuhashi K, Ito K, Nagaoka M, Yonezawa T, Miura Y, Yagasaki K.: Daidzein promotes glucose uptake through glucose transporter 4 translocation to plasma membrane in L6 myocytes and improves glucose homeostasis in Type 2 diabetic model mice. *J Nutr Biochem.* **25**(2): 136-143, 2014.
22. Cheong SH, Furuhashi K, Ito K, Nagaoka M, Yonezawa T, Miura Y, Yagasaki K.: Antihyperglycemic effect of equol, a daidzein derivative, in cultured L6 myocytes and ob/ob mice. *Mol Nutr Food Res.* **58**(2): 267-277, 2014.

23. Zhou F, Furuhashi K, Son MJ, Toyozaki M, Yoshizawa F, Miura Y, Yagasaki K.: Antidiabetic effect of enterolactone in cultured muscle cells and in type 2 diabetic model db/db mice. *Cytotechnology*. **69**(3): 493-502, 2017.
24. Petrie JL, Patman GL, Sinha I, Alexander TD, Reeves HL, Agius L.: The rate of production of uric acid by hepatocytes is a sensitive index of compromised cell ATP homeostasis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. **305**(10): E1255-E1265, 2013.
25. Adachi SI, Yoshizawa F, Yagasaki K.: Assay systems for screening food and natural substances that have anti-hyperuricemic activity: uric acid production in cultured hepatocytes and purine bodies-induced hyperuricemic model mice. *Cytotechnology*. **69**(3): 435-442, 2017.
26. Tang DH, Ye YS, Wang CY, Li ZL, Zheng H, Ma KL.: Potassium oxonate induces acute hyperuricemia in the tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*). *Exp Anim*. **66**(3): 209-216, 2017.
27. Yamaguchi S, Ninomiya K.: Umami and food palatability. *J Nutr*. **130**(4S Suppl): 921S-926S, 2000.
28. Adachi SI, Oyama M, Kondo S, Yagasaki K.: Anti-hyperuricemic effect of rutin in cultured hepatocytes and novel hyperuricemic model mice. JAACT 2018, Tsukuba, November 5-8, 2018, Abstracts of papers p.136.
29. Diwakar G, Rana J, Scholten JD.: Inhibition of melanin production by a combination of Siberian larch and pomegranate fruit extracts. *Fitoterapia*. **83**(6): 989-995, 2012
30. Li C, Huo C, Zhang M, Shi Q.: Chemistry of Chinese yew, *Taxus chinensis* var. *mairei*. *Biochem Syst Ecol*. **36**(4): 266-282, 2008.
31. Sun J, Liu X, Yang T, Slovin J, Chen P.: Profiling polyphenols of two diploid strawberry (*Fragaria vesca*) inbred lines using UHPLC-HRMS(n.). *Food Chem*. **146**: 289-298, 2014.
32. Adachi SI, Nihei KI, Ishihara Y, Yoshizawa F, Yagasaki K.: Anti-hyperuricemic effect of taxifolin in cultured hepatocytes and model mice. *Cytotechnology*. **69**(2): 329-336, 2017.
33. Makena PS, Pierce SC, Chung KT, Sinclair SE.: Comparative mutagenic effects of structurally similar flavonoids quercetin and taxifolin on tester strains *Salmonella typhimurium* TA102 and *Escherichia coli* WP-2 uvrA. *Environ Mol. Mutagen*. **50**(6): 451-459, 2009.
34. Adachi SI, Kondo S, Sato Y, Yoshizawa F, Yagasaki K.: Anti-hyperuricemic effect of isorhamnetin in cultured hepatocytes and model mice: structure — activity relationships of methylquercetins as inhibitors of uric acid production. *Cytotechnology*, 2018. Doi: 10.1007/s10616-018-0275-8

連絡先：矢ヶ崎 一三 (Kazumi Yagasaki, Ph.D.)
宇都宮大学 バイオサイエンス教育研究センター
〒321-8505 栃木県宇都宮市峰町 350
Tel: 028-649-5527 Fax: 028-649-8651
E-mail: c-bio@cc.utsunomiya-u.ac.jp

オメガ-3 脂肪酸合成細菌の新たな利用

Novel use of omega-3 fatty acid-producing bacteria

奥山英登志 (OKUYAMA Hidetoshi) 渡部 和郎 (WATANABE Kazuo)*

* 株式会社ウイズウィグ

Key Words : オメガ-3 脂肪酸合成細菌 *pfa* 遺伝子 EPA DHA 乳酸菌 プロバイオティックス 大腸菌 Nissle 1917

Novel use of omega-3 fatty acid-producing bacteria

Hidetoshi Okuyama

Kazuo Watanabe[†]

[†]WysiWyg Co.,Ltd., Coa Kyobashi Bldg. 6th Floor, 2-21-2 Hatchobori, Chuo-ku, Tokyo 104-0032, Japan
(URL; <http://www.wysiwyg.co.jp>)

[Key words: omega-3 fatty acid-producing bacteria, *pfa* gene, EPA, DHA, lactic acid bacteria, probiotics, *E. coli* Nissle 1917]

Abstract

Omega-3 fatty acids, including eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), play essential roles in human health and development. These fatty acids are typically consumed in foods or supplements derived from fish. However, fish sources are becoming unsustainable due to decreases in fish catch and increases in ocean contamination. A feasible alternative source is eukaryotic microorganisms, such as marine microalgae and gene-modified oleaginous yeasts, and omega-3 fatty acids derived from these microorganisms are now commercially available. Meanwhile, omega-3 fatty acids-producing bacteria are not regarded as source organisms because they lack the ability to accumulate oils in their cells. In 1996, an omega-3 fatty acid synthesis gene cluster (*pfa* gene) was cloned from a marine bacterium. Since then, similar genes have been cloned from various bacteria. As a result, EPA/DHA can now be produced by heterologous expression of the *pfa* gene in *Escherichia coli*. However, EPA/DHA produced in this way is not suitable for human use because *E. coli* is not a food-grade bacterium. Recently, researchers at Guelph University in Canada expressed the *pfa* gene in *Lactobacillus lactis* subsp. MG1363 and in the human probiotic *E. coli* strain Nissle 1917 for the first time. In the future, EPA/DHA-producing lactic and probiotic bacteria could be used in dairy starters and food supplements and for industrial and pharmaceutical purposes, respectively. This paper proposes strategies to increase levels of EPA/DHA in recombinants even at 37°C and discusses further developments in the use of omega-3 fatty acids-producing fermentation and probiotic bacteria.

要 約

魚油に含まれるエイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) などのオメガ-3 脂肪酸は人の発育や健康維持に不可欠の脂肪酸である。近年の魚資源の減少、食卓での魚の摂取量の減少などから、その代替資源としてオメガ-3 脂肪酸蓄積性の微細藻類や遺伝子操作によりオメガ-3 脂肪酸合成能を付与された酵母、植物由来の油脂の開発研究が進んでいる。その一部は既に商品化されている。他方、オメガ-3 脂肪酸を合成する細菌は、その脂質蓄積性の低さから魚の代替えとは見なされていないが、オメガ-3 脂肪酸合成に関わる遺伝子、*pfa* 遺伝子、の供給源となっている。カナダゲルフ大学 (University of Guelph) の研究グループは EPA と DHA を合成する海洋細菌 *Shewanella baltica* MAC1 から *pfa* 遺伝子をクローニングし、これを乳酸発酵のスターター (種) となる乳酸菌 (*Lactobacillus lactis* subsp. MG1363) とプロバイオティクスである大腸菌 Nissle 1917 株に導入し、それぞれの菌で EPA と DHA を合成させることに成功した。このような細菌は、細胞からオメガ-3 脂肪酸を抽出して利用することは異なり、発酵細菌あるいはプロバイオティック細菌として生きたまま摂取できる新たなオメガ-3 脂肪酸資源とみなすことができる。本稿ではこの新しいオメガ-3 脂肪酸合成細菌の利用法を紹介し、この方法をさらに発展させるべく議論した。将来 *pfa* 遺伝子が多様な発酵細菌やプロバイオティック細菌の組換えに応用され、広く利用されることが期待される。

はじめに

人の発育や健康の維持に EPA や DHA などのオメガ-3 脂肪酸が必要であることはよく知られており、その生理機能については多数の報告がある¹⁻⁴⁾。しかし、人はオメガ-3 脂肪酸を新規合成できない上、必須脂肪酸である α -リノレン酸からの EPA や DHA への変換は非常に限られている⁵⁾。そのため必要量の多くは食物またはサプリメントとして摂取しなければならない。オメガ-3 脂肪酸の望まれる摂取量は、年齢、男女別、人種などによって異なるが、おおむね 500 mg/日とされている^{6,7)}。わが国の場合その値はさらに高く、成人男女とも >1 g/日とされる⁸⁾。これは DHA に限定してみると、マグロのトロを毎日 30 g、刺身だと 3,4 切れを食べるのに相当する⁹⁾。トロはいいが毎日となると負担かもしれない。

人のオメガ-3 脂肪酸の主要な摂取源は魚 (魚油) だが、わが国では一人当たりの魚の摂取量は年々減少している¹⁰⁾。加えて海産資源は世界的に減少傾向にあり、深刻化する海洋汚染は有機ハロゲン化合物や重金属などによる魚油の汚染をもたらしている¹¹⁾。これらを背景に、魚に替わるオメガ-3 脂肪酸の供給源を求める研究が 1980 年代から活発に行われている。ターゲットは微生物と植物である。微生物の場合はオメガ-3 脂肪酸の蓄積性が高い自然株や遺伝

子変異株が対象であり、欧米では既に微細藻類や酵母由来のオメガ-3 脂肪酸が魚油の代替えとされている¹²⁻¹⁴⁾。野菜や油糧植物を含めて植物はもともと EPA/DHA を合成しないので、遺伝子の改変が必要である^{15,16)}。アブラナ科の油糧植物で、その油脂が魚油の代替えとして栽培漁業で使われているカメリナ (*Camelina sativa*) などがその例である¹⁶⁾。

微生物由来のオメガ-3 脂肪酸を魚油の代替えにする場合は、①微生物が合成 / 蓄積したオメガ-3 脂肪酸からなる油脂を抽出して直接またはサプリメントとして用いる、②栽培漁業などで、オメガ-3 脂肪酸を含む微生物細胞 (バイオマス) や油脂を添加物として飼料に使う、という二通りがある (図 1A)。現在これに関わる研究成果の多くは実用のレベルに達している上、さらにより適切な微生物の取得と培養の新手法の開発や至適条件の設定などの Upstream processing (上流処理工程) と、細胞回収、脂質の抽出や精製などの条件の至適化や開発を行う Downstream processing (下流処理工程) のそれぞれに注目した研究開発が進められている^{13-15,17,18)}。

他方、微生物には歴史的に発酵食品の製造など人間の生活に深く関わっているものが多い。中でも細菌には発酵細菌のほか、プロバイオティクスとして体内に常在すること

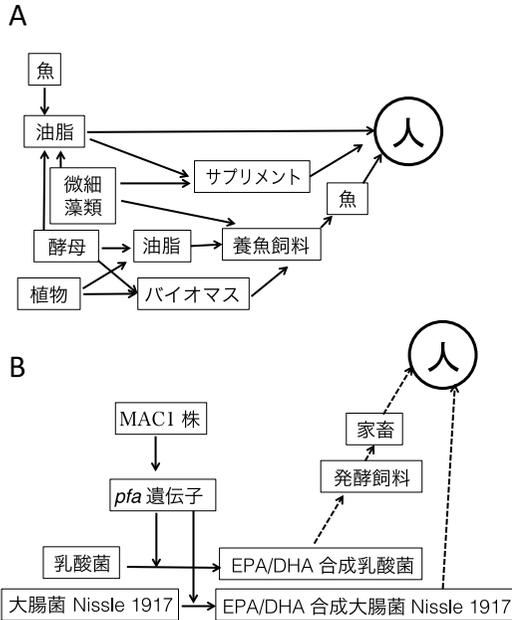


図1 オメガ-3脂肪酸(油脂)利用の模式図

A: 魚, 微細藻類, 酵母, 植物由来のオメガ-3脂肪酸(油脂)の利用

B: 細菌の *pfa* 遺伝子を使った組換え体の作成と利用の模式図。カナダゲルフ大学グループの研究スキームを, 文献 35,49,50 をもとに作成した。実線は既に実施されている過程, 破線は実施が期待される過程を示す。

によって人の健康に一定の役割を果たすものもある^{19,20}。もし発酵細菌やプロバイオティク細菌がオメガ-3脂肪酸合成能をもつ場合, これらの細菌は生きた状態での利用が可能であり, そのオメガ-3脂肪酸は油脂として摂取される場合とは異なる特有の機能を持つことが期待される。

本稿では初めにオメガ-3脂肪酸を合成する微生物とその利用について簡単に述べ, ついでオメガ-3脂肪酸合成能を初めて発酵細菌の乳酸菌とプロバイオティクスである大腸菌 Nissle 1917 株に付与したカナダゲルフ大学(University of Guelph)の研究グループの研究結果(図1B参照)を中心に, オメガ-3脂肪酸合成細菌の新たな利用性について紹介, 議論する。

1. オメガ-3脂肪酸を産生する微生物

微生物には EPA や DHA などのオメガ-3脂肪酸を自ら合成し, 蓄積するものがある。これを便宜上真核微生物と原核微生物に分けると, 真核微生物には *Thraustochytrium*, *Schizochytrium*, *Aurantiochytrium* などのラビリンチュラ類を含む従属栄養性微生物^{12,21,22}と, 珪藻類¹³や真正眼点藻類の *Nannochloropsis*²³ など光合成をおこなう独立栄養性の藻類が含まれる。一部のラビリンチュラ類微生物から抽出された DHA で *Schizochytrium* 由来のものはシングルセルオイル (SCO) として「DHASCO-S」や「Life's DHATM」, *Ulkenia* 由来のものは「DHActive」という名で商品化されている^{12,13}。また, DHA と EPA が 2:1 の割合で含まれている *Schizochytrium* 由来の油脂は「Life's OmegaTM」として市場に出ている¹³。同様にウズベンモウ藻に属す藻類だが従属栄養性である *Cryptocodinium cohnii*²⁴ 由来の DHA は, 「DHASCOTM」として商品化されている¹²。また, Aurora Algae 社は *Nannochloropsis* 由来の EPA を「A2 EPA PureTM」として製造している¹³。これらの微生物は従属栄養性, 独立栄養性のいかんにかかわらずまとめて微細藻類「microalgae」と呼ばれることが多い。ここでもこの用語を使う。これらの微細藻類については, 私たちはその生物が本来もつオメガ-3脂肪酸合成能と細胞内への蓄積能力の高さをそのまま利用していることになる。一方, 酵母の *Yarrowia lipolytica* も脂質蓄積性の高い真核微生物だが, オメガ-3脂肪酸を合成しない。しかし最近, Du Pont 社は EPA 合成能を付与した *Y. lipolytica* の変異株を作出した¹⁴。この酵母由来の EPA は人間のサプリメント「New HarvestTM EPA」として, バイオマスを飼料として飼育した鮭は「Verlasso[®] salmon」として商品化されている¹⁴。

原核微生物では, グラム陰性でガンマプロテオバクテリアに属す限られた細菌がオメガ-3脂肪酸合成能力を持っている。多くは海産で, EPA を合成する *Shewanella*, *Photobacterium*

などの属と、DHAを合成する *Colwellia*, *Moritella* などの属のものが知られている²⁵⁾。1980年代以降、オメガ-3脂肪酸を合成する細菌も魚油の代替え資源として活発に研究されてきた。しかし、現時点で細菌由来のオメガ-3脂肪酸は、自然株由来、遺伝子変異株由来ともに魚油の代替え資源とはみなされていない。その最大の理由は細菌の脂質蓄積性の低さにある。

脂質蓄積性微生物は一般的に脂肪酸をトリアシルグリセロール（脂肪）として蓄積する。私たちが利用する魚油は魚に貯蔵された脂肪であり、その点では脂質蓄積性微生物も変わらない。しかし、細菌にはわずかな例外²⁶⁾を除いて脂肪の蓄積性がなく、仮にオメガ-3脂肪酸が合成されたとしても、他の脂肪酸と同様にリン脂質に取り込まれるに過ぎない。リン脂質は細胞膜を構成する主要脂質成分であり、細胞を取り囲むだけしか存在しない。今後、高い増殖速度をもちながら、高密度培養が可能で、さらに脂質を高度に蓄積するタイプの細菌が自然株としてあるいは遺伝子操作株として得られない限り、細菌をこの目的で用いることは極めて難しいと考えられる。しかし、以下に詳述するようにオメガ-3脂肪酸合成細菌はオメガ-3脂肪酸合成酵素遺伝子の重要な供給源となっている。

2. 細菌のオメガ-3脂肪酸合成に関わる *pfa* 遺伝子

1988年に相模中央化学研究所のグループによって単離された *Shewanella* 属の細菌²⁷⁾ [後年 *Shewanella pneumatophori* strain SCRC-2738 と同定²⁸⁾。以下 SCRC-2738 株という] は魚油の代替え EPA 源として初めて報告された細菌である。SCRC-2738 株については、その EPA 生産性について種々検討された²⁹⁾ もの、魚に代わるオメガ-3脂肪酸資源とはならなかった。しかし、この細菌から初めて EPA 合成に関わる遺伝子、*pfa* 遺伝子、がクローニングされた^{30, 31)}。この成果は後に多数の細菌から EPA 合成に関わる *pfa* 遺伝子^{32, 33)} と DHA の合成に関わる *pfa* 遺伝子³⁴⁻³⁶⁾ のクローニングをもたらした。

また、類似遺伝子が真核微生物からもクローニングされている^{37, 38)}。さらに *pfa* 遺伝子の³⁹⁻⁴¹⁾ 大腸菌での発現系³⁹⁻⁴¹⁾ や、EPA 合成菌の *pfa* 遺伝子欠損株⁴²⁻⁴⁷⁾ を使うことによって、細菌におけるオメガ-3脂肪酸の多様な生理機能が解明された。

SCRC-2738 株の *pfa* 遺伝子がクローニングされた当時、細菌における脂肪酸の不飽和化は動物や植物の場合と同様に酸素に依存する脂肪酸不飽和化反応で進行すると考えられていた。しかし、*pfa* 遺伝子の塩基配列から推定されるアミノ酸配列には酸素依存型脂肪酸不飽和化酵素と類似のアミノ酸配列がなく、細菌や一部の真核微生物のオメガ-3脂肪酸は酸素非依存的(嫌氣的)に、即ちポリケチド合成様式によって合成されることが明らかになった³⁷⁾。この合成様式は、後述するようにプロバイオティックスが人の腸内という嫌気環境でもオメガ-3脂肪酸を合成できるという、酸素依存型脂肪酸不飽和化反応にはない利点をもつ。

3. *Shewanella baltica* MAC1 の *pfa* 遺伝子のクローニングとその特徴

魚の腸から単離された *Shewanella baltica* MAC1 (以下 MAC1 株) は海洋細菌であり、EPA (全脂肪酸の 1.7%) と DHA (全脂肪酸の 0.04%) の両方を合成する³⁵⁾。カナダゲルフ大学の研究グループは、MAC1 株からオメガ-3脂肪酸合成に関わる *pfa* 遺伝子を含むと思われる約 36 kb の DNA 断片をフォスミドベクターにクローニングした (fEPA/DHA という)³⁵⁾。この fEPA/DHA を大腸菌に導入することによって EPA (全脂肪酸の 10% 前後) と微量 (1% 以下) の DHA が生成され、fEPA/DHA が EPA と DHA の合成に関与する *pfa* 遺伝子 (*pfaE*, *pfaA*, *pfaB*, *pfaC*, *pfaD* の 5 遺伝子からなる) を含むことが確認された。fEPA/DHA を発現した大腸菌 EPI300-T1/fEPA/DHA の EPA と DHA の生成量は元株である MAC1 株よりも培養温度に関わらず顕著に増加した。生成量が最大となる培養温度 15°C での EPA の含量は MAC1 株の 7 倍

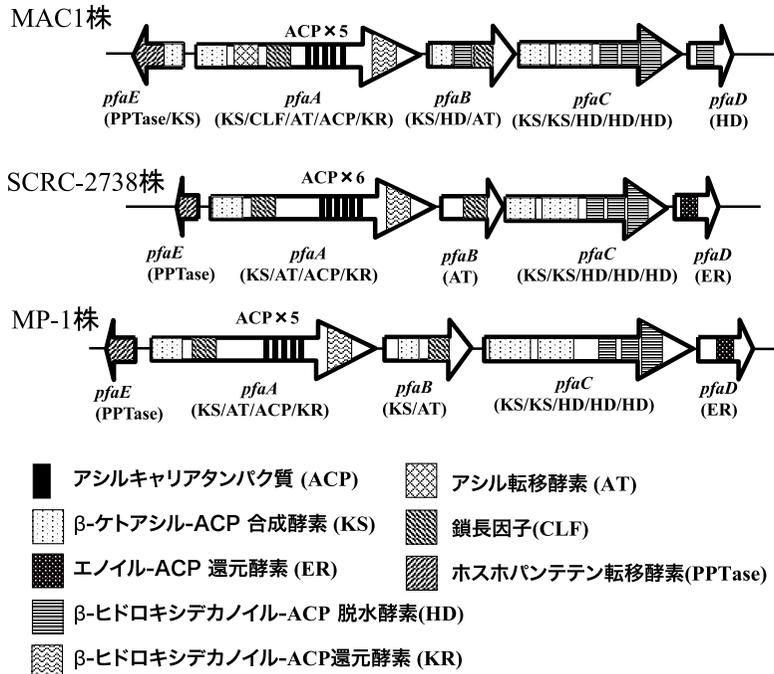


図2 オメガ-3脂肪酸合成細菌 *Shewanella baltica* MAC1 (MAC1株), *Shewanella pneumatophori* SCRC-2738 (SCRC-2738株), *Moritella marina* MP-1 (MP-1株) の *pfa* 遺伝子のドメイン構造の模式図

それぞれの菌の各 *pfa* 遺伝子の下には図を補うために、遺伝子上に存在するドメイン名の略称をカッコ内に記した。ACP ドメインについてはその数が多いので、*pfaA* 遺伝子の上にリピート数を記した。各遺伝子のサイズ、遺伝子中の各機能ドメインのサイズは実際の大きさを反映していない。またオメガ-3脂肪酸合成に関わらない遺伝子については省いている場合がある。MAC1 は文献 35, SCRC-2738 株と MP-1 株については文献 78 を参照して作成した。なお、MP-1 株の *pfaE* はゲノムの上では *pfaA*–*pfaD* の近傍には存在しないが、Orikasa らにより別途クローニングされ *pfaA*–*pfaD* とともに pDHA4 として 1 つのベクターにまとめられている⁴⁸⁾ ので、それをもとに模式図を作成した。但し、pDHA4 上の *pfaE* の方向は確定されていない⁴⁸⁾。*pfa* 遺伝子中の各機能ドメインが触媒する予想される個別の反応と EPA および DHA の合成過程については文献 37 と 79 を参照されたい。

の 20 mg/g dry cell であった³⁵⁾。

FEPA/DHA に存在する *pfa* 遺伝子群の推定アミノ酸配列は、EPA 合成に関わる SCRC-2738 株や *Photobacterium profundum* SS9 の *pfa* 遺伝子、および主として DHA の合成に関わる *Moritella marina* MP-1 (以下 MP-1 株) の *pfa* 遺伝子の推定アミノ酸配列と相同性が低かった³⁵⁾。MAC1 株の *pfa* 遺伝子の構造と SCRC-2738 株および MP-1 株の *pfa* 遺伝子の構造を図 2 に示す。3 者の *pfa* 遺伝子は 5 個の個別遺伝子からなる点は共通だが、各々の遺伝子の機能ドメイン構造を子細に見ると、MAC1 株の *pfaB* は β-ケトアシル-アシルキャリアタンパク質 (ACP) 合成酵素 (KS)、β-ケトアシル-ACP 転移酵素

(AT) ドメインに加えて β-ヒドロキシデカノイル-ACP 脱水酵素 (HD) ドメインを持つ点で、SCRC-2738 株や MP-1 株の *pfaB* 遺伝子と異なっていた。また、MAC1 株の *pfa* 遺伝子はホスホパンテテン転移酵素 (ppTase) ドメインに加えて KS ドメインからなる特徴的な *pfaE* を持つという点でも、SCRC-2738 株や MP-1 株の *pfa* 遺伝子と異なっていた³⁵⁾。MAC1 株の *pfa* 遺伝子は EPA と DHA の双方の合成に関わっており、例えば EPA 合成だけに関わる SCRC-2738 株の *pfa* 遺伝子とは機能の面でも異なっている。Orikasa らは MP-1 株の場合、*pfaB* に存在する KS ドメインの存在がオメガ-3脂肪酸の最終産物を DHA に決める要因であることを明らかに

している⁴⁸⁾。MAC1株の場合もMP-1株の*pfa*遺伝子と同様に、*pfaB*上にATドメインに加えてKSドメインが存在するので、このKSドメインの存在がEPAとDHAが合成される主因と考えられる。MAC1株の*pfa*遺伝子の他の特徴的なドメイン構造がどのような機能をもたらすかについては不明である。

4. 食用 (food-grade) 微生物を標的とした *pfa* 遺伝子の発現ベクター

遺伝子操作をする場合、クローニングされた遺伝子は*pfa*遺伝子に限らず、DH5 α 株やJM109株など外来遺伝子の導入を目的として作成された大腸菌株を宿主として発現されるのが普通である。上に述べたように*pfa*遺伝子は大腸菌で発現させた場合、宿主として用いられる大腸菌株によっては元株以上のオメガ-3脂肪酸を生成することがある。しかし、一般的に外来遺伝子の発現に用いられる大腸菌は食用 (food-grade) 微生物でないため、仮にそれがEPAやDHAなどの有用物質を多量に生成したとしても、遺伝子を組換えた細胞そのものを食品として用いることはできない⁴⁹⁾。

興味深いことに、最近カナダダゲルフ大のグループは*pfa*遺伝子の組換え体の直接利用を考え、MAC1株の*pfa*遺伝子を乳酸発酵のスターター (種) となる乳酸菌 (*Lactobacillus lactis* subsp. MG1363)⁴⁹⁾ とプロバイオティクスである大腸菌 Nissle 1917 株⁵⁰⁾ への導入を試みた。*pfa* 遺伝子の乳酸菌での発現は初めてであり、グラム陽性菌に*pfa* 遺伝子を導入したという点でも特筆される。

MAC1株由来の*pfa*遺伝子を乳酸菌で発現させるため、Amiri-Jamiらは先ず*pfa*遺伝子を含む36 kbのインサートをもつ*fEPA/DHA*からオメガ-3脂肪酸合成に関わらない塩基配列を取り除いた約20 kbの断片を調製し、それを大腸菌用ベクターであるpCC1FOSと大腸菌と乳酸菌のシャトルベクターであるpClacに導入した (遺伝子導入後得られたプラスミドをそれぞれpfBS-PS, placBS-PSと名付けた)⁴⁹⁾。これら

のプラスミドを大腸菌EPI300T1に導入すると、組換え大腸菌EPI300T1/pfBS-PSのEPA含量は顕著に増加した。培養温度15°Cの場合は最大値で120 mg EPA/g dry cellに達し、そのレベルは大腸菌EPI300T1/*fEPA/DHA*に比べて3.5–6.1倍、元株であるMAC1株に比べて30–50倍高かった⁴⁹⁾。これらの結果は、元株の*pfa*遺伝子の上下流に存在する遺伝子がオメガ-3脂肪酸合成を下方制御 (down regulate) していることを示唆するが、さらに*pfa*遺伝子のコピー数が、元株ではゲノム中の1コピー、フォスミドベクターを用いた場合は数コピー、プラスミドは多コピーであるためとも考えられる⁴⁹⁾。一方で発現ベクターplacBS-PSを用いても乳酸菌の形質転換は成功しなかった⁴⁹⁾。

20 kbに及ぶ大サイズのDNA断片を用いた乳酸菌の形質転換は2010年当時知る限り例がなく、同程度のサイズを持つ*pfa*遺伝子の場合もpClacなど各種の乳酸菌用ベクターを使用する限り効果はなかった⁴⁹⁾。しかし、乳酸菌用ベクターで低コピー性プラスミドであるpIL252を用いたときにのみ*pfa*遺伝子のクローニングが確認された。ただ、*pfa*遺伝子を導入されたプラスミドpIL252は乳酸菌内で世代に渡って保持されることはなかった。Amiri-Jamiらは最終的にpIL252のマルチクローニングサイトを人工的なクローニングサイトに置き換えたベクターpIL252mを作成し、これに20 kbの*pfa*遺伝子を導入した (pEDSB)⁴⁹⁾。pEDSBは乳酸菌*L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363細胞内で安定に保持された。こうして得られた乳酸菌*L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363の形質転換株 (*L. lactis* MGED20) は、培養温度に関わらずEPAとDHAを生成した⁴⁹⁾。

5. *pfa* 遺伝子を導入した乳酸菌 (*L. lactis* MGED20) の特性

L. lactis MGED20はMAC1株や*pfa*遺伝子を導入した大腸菌には見られない特性を示した。先ず*L. lactis* MGED20は、元株である*L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363の生育至適温度

である 30°C で最も高い割合の EPA/DHA を生成した⁴⁹⁾。この性質は、MAC1 株と大腸菌 EPI300T1/pfBS-PS では、ともに 15°C でもっとも高い割合の EPA/DHA を生成することと大きく異なっていた。この結果は *L. lactis* MGED20 においてはオメガ-3 脂肪酸合成の温度制御因子や酵素が存在しないためと考えられている⁴⁹⁾。

2 つ目は、*L. lactis* MGED20 と組換え大腸菌で生成される EPA と DHA の量の違いである。大腸菌 EPI300T1/pfBS-PS の場合、15°C で生成される EPA は先述したように 120 mg/g dry cell だが、*L. lactis* MGED20 の場合は培養温度 30°C でも 0.12 mg/g dry cell と 1000 分の 1 に過ぎなかった。加えて、元株の MAC1 株や組換え大腸菌では、生成される EPA 量は DHA 量よりも常に数十倍から 100 倍程度高いのに対して、*L. lactis* MGED20 では培養温度に関わらず、DHA 含量は EPA 含量より高く、30°C で 1.35 mg/g dry cell であった⁴⁹⁾。この理由についての著者による説明はないが、*L. lactis* MGED20 では DHA と EPA の合成活性が極端に低く、加えて膜リン脂質合成におけるアシル基転移酵素の基質特異性が DHA と EPA で異なるなど、オメガ-3 脂肪酸合成後の反応系に違いがあるためかもしれない。

L. lactis MGED20 で EPA, DHA とともにその含量が大きく低下する理由はいくつか考えられる: ① *L. lactis* MGED20 で使われているプラスミド pIL252 のコピー数 (6-9 コピー/細胞) が大腸菌の形質転換で使われているプラスミドのコピー数よりも小さく、20 kb に及ぶ大きなインサートを持っている pEDSB の場合は、そのコピー数はホストの細胞内ではさらに少なくなることが予想される、② pIL252 (pEDSB) の複製が、ホストである乳酸菌の細胞分裂と厳密に同調しておらず、細胞を EPA/DHA の抽出の段階まで培養したときにはすでにプラスミドをもたないホスト (乳酸菌) 細胞が優占している可能性がある、③ グラム陽性菌である乳酸菌は細胞膜しか持たないため、細胞膜 (細胞内膜) と細胞外膜からなる大腸菌に比べて脂肪酸の含

量そのものが低くなる、ことなどである⁴⁹⁾。

6. *pfa* 遺伝子のプロバイオティック大腸菌 Nissle 1917 での発現

人が体内に取り入れても病原性を示さず、かつ腸内の菌叢のバランスを改善することによって健康に良い影響を与える微生物はプロバイオティクス (プロバイオティック微生物) とよばれる^{20, 51, 52)}。大腸菌 Nissle 1917 株 (以下 EcN1917 株) はこれまで最もよく研究されてきたプロバイオティック細菌の 1 種である^{50, 53)}。EcN1917 株は小腸侵入性病原菌 (例えば赤痢菌) に対して抗侵入性効果を示す物質を分泌することが知られている^{50, 54)}。また、EcN1917 株は腸粘膜上で高いコロニー形成 (増殖) 能を示し、この性質によって自らが合成した組換えタンパク質を安全な運搬体 (safe carrier) として粘膜細胞内に導入することが知られている⁵⁵⁾。Amiri-Jami らは、EcN1917 株のこのような性質を考慮し、新たな EPA/DHA 源として EPA/DHA 合成能をもつプロバイオティック大腸菌の作成を試みた⁵⁰⁾。

EcN1917 の形質転換は *pfa* 遺伝子を含むプラスミド pfBS-PS を用いることによって達成された⁵⁰⁾。形質転換株 (gEcN1917 株) は 10°C から 25°C の範囲で EPA を生成したが、DHA の検出は元株である MAC1 株と同様に痕跡 (trace) 程度であった。EPA の生産量は 15°C で 31.36 mg/g dry cell で、この量は元株 MAC1 株の同条件での生産量のおおよそ 16 倍であった^{35, 50)}。高いレベルの EPA と微量だが DHA を生成する gEcN1917 株は、人の体内で EPA/DHA を合成してそれをホストに供給するという、EPA と DHA の新たな供給源になるとみなされている⁵⁰⁾。

7. *pfa* 遺伝子の乳酸菌、プロバイオティック大腸菌での発現の課題

カナダゲルフ大学の研究グループによる乳酸菌とプロバイオティクスでの *pfa* 遺伝子発現は微生物生産された EPA/DHA の新しい利用を目指す上で画期的である。一方で実用化に至るまでには解決すべき課題も多くある。今後

<p>発酵細菌とプロバイオティック細菌共通の課題</p> <ul style="list-style-type: none"> • EPA 合成, DHA 合成に特異的な <i>pfa</i> 遺伝子の使用 (EPA に関しては SCRC-2738 株由来の <i>pfa</i> 遺伝子などの利用) • EPA/DHA 含量の増大 (多コピー性ベクターの利用, 個別の Pfa 酵素タンパク質の量比の至適化, <i>vktA</i> 遺伝子の共発現, プロモーターの改変, <i>pfaA</i> 遺伝子上の ACP ドメイン数の増大など) • より高い温度での EPA/DHA の合成 (<i>S. oshoroensis</i> など常温性オメガ-3 脂肪酸合成細菌由来の <i>pfa</i> 遺伝子, ラビリンチュラ類の相同遺伝子などの利用) • 発酵細菌を含む多様な食用微生物を宿主として利用 (各種乳酸菌, 納豆菌, 酢酸菌, パン酵母など)
<p>プロバイオティック細菌の課題</p> <ul style="list-style-type: none"> • EPA/DHA の細胞外への輸送系の開発 • 乳酸菌など多様なプロバイオティック微生物を宿主として利用

図3 遺伝子組み換えによってオメガ-3脂肪酸を合成する発酵細菌, プロバイオティック細菌の作出における課題と考えられる解決法

の課題について以下に述べるとともに図3にまとめた。

MAC1株ではEPAとDHAの両方が合成される。MAC1株の*pfa*遺伝子による乳酸菌やプロバイオティック大腸菌の組換え体でもEPAとDHAの両方が合成されるうえ、全脂肪酸に対するどちらか一方の割合は他方に比べて大幅に低下する^{35, 49, 50)}。このような場合、食用微生物の遺伝子組換え体がEPAまたはDHAを生成するという付加的機能の有効性は評価しにくいと考えられる。その点、例えばEPAのみの合成に関わるSCRC-2738の高発現性の*pfa*遺伝子プラスミド(pBA-NEB Δ1,3,4,9) [EPAは全脂肪酸の16.4%³¹⁾]や、大腸菌の組換え体ではDHAの生成だけに関わるMP-1株の*pfa*遺伝子(pDHA4) [全脂肪酸の3.7%⁴⁸⁾]を用いれば、組換え体ではEPAまたはDHAのみが生成され、それぞれのオメガ-3脂肪酸の有効性の評価が可能になる。

ポリケチド合成様式でEPAとDHAが合成される場合、合成の初発物質と合成過程でのC2ユニットの供与体はともにアセチル-CoAであり、合成反応系も途中までは同じと考えられる⁴⁸⁾。即ち、EPAとDHAの合成は競合するので、1種類の組換え体の中でEPAとDHAの合成量を共に増大させる組換え体の作成は非常に難し

いと考えられる。これを可能とするには全く新たな手法の開発が必要であろう。しかし、遺伝子を組換えた乳酸菌を使って任意の割合でEPAとDHAの両方を摂取することは、EPAを合成する組換え細胞とDHAを合成する組換え細胞を必要に応じて混合して用いればよく、容易である。これはgEcN1917株を用いる場合についても同様である。

L. lactis MGED20の場合には生成されるEPA/DHAの量が著しく低く、改善の余地がある。このためには現在使っている低コピー性のプラスミドpIL252を多コピー性に替える必要がある。Leeらは、*Shewanella oneidensis* MR-1の*pfa*遺伝子の上流に*lac*プロモータをつなぎ、本来のプロモータを使ったときの11倍量のEPAを生成させている⁵⁶⁾。Orikasaらは、SCRC-2738株の*pfaA-pfaD*の4遺伝子を持つベクターpPA-NEB Δ1,2,4,9と*pfaE*だけを持つベクターORF2/pSTV28を大腸菌で共発現させることによって、*pfaA-pfaE*の5遺伝子全てをもつベクターpBA-NEB Δ1,3,4,9を単独で発現させた場合よりも、EPA含量が高くなる(全脂肪酸の16.4%→21.6%)ことを示している³¹⁾。ここで用いられたベクターはともに多コピー性プラスミドだが、pPA-NEB Δ1,2,4,9とORF2/pSTV28が共存した場合には、合成されるPfaA-PfaD

の4種類のタンパク質と PfaE タンパク質の量比が異なり、それが生成される EPA 量を増加させている可能性がある。上に述べたように gEcN1917 株は MAC1 株の 16 倍の EPA を生成するが、このとき 16S rRNA 遺伝子の発現量を基準とした *pfaA*–*pfaE* の発現量は過剰であり、特に *pfaB*, *pfaC*, *pfaD* は *pfaA* と *pfaE* に比較してさらに 10 倍ないしそれ以上過剰に発現している⁵⁰⁾。このような事実から組換え体における各 Pfa タンパク質の絶対量を増やすとともに、個別の Pfa タンパク質の量比を最適化することによってオメガ-3 脂肪酸の生成量を最大にすることも可能と考えられる。

pfa 遺伝子の *pfaA* には ACP のドメインが 4–6 個程度タンデムに並んでいる (図 2)。真核微生物の *pfaA* に相当する遺伝子 (*pfaI* または *orfA* などという) にはさらに多数の ACP ドメインが存在する^{37, 38)}。最近, *orfA* 上に 9 個の ACP ドメインをもつ *Schizochytrium* sp. (ATCC20888) を使った研究で, ACP ドメインの数を減らすと (増やすと) 生成する DHA 量が減る (増える) ことが明らかにされた³⁸⁾。このような ACP ドメイン数と合成されるオメガ-3 脂肪酸量との関係が細菌の場合も同じであれば, *pfaA* の ACP ドメイン数を増やすことによる EPA/DHA 合成活性の増大が可能である。

Orikasa らは大腸菌で *pfa* 遺伝子を発現する際に, *pfa* 遺伝子を単独で発現させるよりも, 高活性カタラーゼ遺伝子 (*vktA*) を共発現させた場合の方がより高いレベルの EPA (全脂肪酸の 3% → 12%) が生成されることを示している⁵⁷⁾。生理的メカニズムは不明だが, これも遺伝子組換え体のオメガ-3 脂肪酸含量を増大させる手法となり得る。

人のプロバイオティクスに EPA/DHA 合成能を付与した場合の現時点での最大の問題点は, *pfa* 遺伝子が体温の 37°C では機能しないことにある。これまで報告されている EPA/DHA 生産菌のほとんどは好冷性である⁵⁸⁾ ことから, Pfa タンパク質が高い温度で機能しにくいのは一

般的な性質とみてよい。実際に MAC1 株³⁵⁾ だけではなく, SCRC-2738 株の *pfa* 遺伝子を導入した大腸菌の場合でも 30°C で EPA の生成は見られない³¹⁾。現時点で Pfa タンパク質そのものの温度特性についての知見がないので, この現象が個別の Pfa タンパク質の性質に起因するか, 他の要因によるかは不明である。

この課題を解決する手段の一つは, 37°C またはそれ以上の温度でも EPA/DHA を合成する細菌に由来する *pfa* 遺伝子を使用することであろう。例えば, 北海道の沿岸から単離された *Shewanella oshoroensis* osh08^T 株は常温性であり⁵⁹⁾, 37°C でも EPA を生成する [全脂肪酸の 0.2%⁶⁰⁾] ので Pfa タンパク質が 37°C でも機能することがわかる。*pfa* 遺伝子はまだクローニングされていないが, *S. oshoroensis* osh08^T 株は人の体内でも十分に機能する *pfa* 遺伝子を提供すると考えられる。EPA 産生細菌は沖縄県のマングローブ林の海水などからも単離されている⁶¹⁾。Shulse and Allen は, *pfaA* の KS ドメインの配列をターゲットとしたプライマーを用いて世界各地の海洋から得た DNA サンプル中の *pfaA* の分布を調べ, *pfa* 様遺伝子が温暖で浅い海域に及んでいることを示している⁶²⁾。今後, より高い温度でも機能する *pfa* 遺伝子をもつ細菌が得られる可能性がある。

Vibrio, *Moritella*, *Colwellia* などに属す DHA 産生細菌は一般的に EPA 産生細菌に比べてさらに好冷性が強く, その増殖の最高温度は 20°C 程度である^{58, 63, 64)}。MP-1 株の *pfa* 遺伝子を導入した大腸菌の DHA 生成量は 20°C よりも 15°C が高く, 25°C では検出されない⁶⁵⁾。この *pfa* 遺伝子は 37°C では全く機能しないとみられる。しかし, 細菌とは異なり *Schizocytrium limacinum* には 37°C で DHA を生成する株も存在する⁶⁶⁾ ことから, このような生物に由来する遺伝子を利用することもできる。この問題が解決すれば, EcN1917 だけではなくプロバイオティック乳酸菌など, より多様なプロバイオティック微生物での応用が可能になる。

プロバイオティクスによって合成されたオメ

ガ-3脂肪酸が、ホストである人の腸の細胞へどのように供給（輸送）されるかについては、オメガ-3脂肪酸の十分な生成量とは別の重要な課題である。EcN1917株で遺伝子組換えタンパク質を細胞の外へ輸送する場合、組換え体タンパク質にシグナル配列を持たせるなど分泌タンパク質として合成させればよい。遺伝子組換えされたEcN1917株で合成、分泌されるdefensin⁶⁷⁾の場合がそれに当たる。しかし、この例はオメガ-3脂肪酸には当てはまらない。

栄養失調児の致死的な下痢の原因とされるビタミンA欠乏症で、その欠乏を補うために遺伝子組換えによってβ-カロチン合成能を付与されたEcN1917株を、プロバイオティックスとして利用しようという試みがある^{68, 69)}。ここではEcN1917株の細胞膜を介したβ-カロチンの輸送系遺伝子の導入が考えられている⁶⁸⁾。プロバイオティックスのオメガ-3脂肪酸についてもその膜輸送系について検討する必要がある。しかし一方で、β-カロチンからビタミンAへの変換能力を失ったマウスに、β-カロチン合成能を付与した大腸菌(*E. coli* MG1655*-βC)を経口投与した*in vivo*実験では、マウスの血清、肝臓、小腸、糞便にβ-カロチンが検出され、加えて糞便中には投与した数以上の遺伝子組換え大腸菌が認められている⁶⁹⁾。この結果は組換え大腸菌がマウス小腸で増殖するだけでなく、組織にβ-カロチンを供給していること示しており、その供給手段の1つとして組換え細胞の寿命による死とそれに伴うβ-カロチンの細胞外へのリークが想定されている⁶⁹⁾。*pfa*遺伝子で形質転換されたプロバイオティックスも人の小腸に棲みつき、同様の過程を経てオメガ-3脂肪酸をホストに提供する可能性が考えられる。

8. 様々な細菌での *pfa* 遺伝子の発現

ゲルフ大のグループが*pfa*遺伝子の異種生物発現のホストとして乳酸菌を選んだのは、乳酸発酵のスターターや飼料へ添加する微生物にオメガ-3脂肪酸合成能を付与することを念

頭においたためである⁴⁹⁾。この場合、その乳酸菌は必ずしも人や家畜のプロバイオティックスとしてはたらくことを期待されておらず、遺伝子組換え株が増殖できる温度は人の体内の固定した高い温度(37°C)である必要はない。乳酸菌の生育温度の範囲でオメガ-3脂肪酸合成が可能な温度を選べばよいので、遺伝子組換え株はより利用しやすくなる。同じ観点から乳酸菌だけではなく納豆菌、酢酸菌や酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)などの食用発酵微生物や食品として用いられているシアノバクテリア(ラン藻)への応用が考えられる。食経験のない種だが、シアノバクテリア対しては既にSCRC-2738株の*pfa*遺伝子^{70, 71)}や脂肪酸不飽和化酵素遺伝子⁷²⁾の導入が試みられている。グラム陽性菌である納豆菌(*Bacillus subtilis* var. *natto*)の*pfa*遺伝子による形質転換は、乳酸菌*L. lactis* MGED20の例が参考になるかもしれない。興味深いことに、グラム陽性菌*Ilumatobacter coccineum* YM16-304^Tは、分析した限りオメガ-3不飽和脂肪酸は検出されていない⁷³⁾ものの、ゲノム解析の結果*pfa*遺伝子(*pfaA*-*pfaD*)をもつことがわかっている⁷⁴⁾。グラム陽性菌での*pfa*遺伝子発現に、*I. coccineum* YM16-304^Tなどグラム陽性菌の*pfa*遺伝子の一部または全部を使ってみることも可能であろう。

筆者の知る限り、*pfa*遺伝子を発酵細菌やプロバイオティック細菌で発現させた研究成果の報告はゲルフ大のグループからだけのようである。出版はされていないが同グループは*pfa*遺伝子の乳酸菌*Streptococcus thermophilus*での発現にも成功している⁷⁵⁾。また、ニュージーランドオタゴ大(University of Otago)のグループは、細菌としては例外的に脂肪を蓄積するグラム陽性の*Rhodococcus opacus* PD630に、MP-1株由来の*pfa*遺伝子(pDHA4)の導入を試みている⁷⁶⁾。

SCRC-2738株から初めてEPA合成に関わる*pfa*遺伝子が単離されたときに、この遺伝子の酵母、藻類、植物などでの異種生物発現によ

る新しいタイプの食品開発の夢が語られている³⁰⁾。本稿の内容は遺伝子組換え細胞からオメガ-3脂肪酸を抽出して食品として利用する、あるいは遺伝子組換え細胞（バイオマス）を栽培漁業で飼料するというレベルを超え、生きた組換え体を発酵食品として利用し、さらにはプロバイオティクスとして体内に入れて増殖させようということであり、私たち日本人にとっては特に過激な利用法である。技術的な困難さだけでなく解決すべき課題は多いが、カナダゲルフ大学グループの研究成果は20年前の夢の実現へ私たちを1歩近づけたと言える。

補足：上に述べたようにMAC1株由来の*pfa*遺伝子を導入した大腸菌EPI300T1/pfBS-PSは15°Cで120 mg EPA/g dry cell, プロバイオティクス大腸菌gEcN1917は31.36 mg EPA/g dry cellを生成する。この値は、Du Pont社のEPA合成酵母*Y. lipolytica*のEPAの含量である>250 mg/g dry cell¹⁴⁾に比べて決して低く過ぎるという

ことはない。両者の違いは培養液量当たりのバイオマス収量にあると思われる。*Y. lipolytica*のバイオマス収量は>100 g/L¹⁴⁾だが、大腸菌EPI300T1/pfBS-PSやgEcN1917については文献中に記載がない^{50, 49)}。大腸菌の菌株にもよるが、大腸菌EPI300T1を含め遺伝子操作で用いられる各種大腸菌株の元株であるK-12株の細胞収量が180–190 g/Lに及ぶという報告⁷⁷⁾もある。gEcN1917の場合も細胞収量の最大化を検討することによって、プロバイオティクスとしてだけではなく、魚に代わるオメガ-3脂肪酸源としての利用が可能になるかもしれない。この場合のオメガ-3脂肪酸は脂肪ではなくリン脂質成分として得られるはずである。

謝辞

大腸菌Nissle 1917のβ-カロチンの合成にかかる文献など、関連情報をご提供くださったアメリカ合衆国SRI InternationalのDouglas S. Watson博士に感謝申し上げます。

引用文献

1. Dyerberg J, Bag HO, and Stoffersen E: Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis? *The Lancet* **312**(8081): 117-119, 1978.
2. Hallahan B and Garland R: Essential fatty acids and mental health. *The British Journal of Psychiatry* **186**(4): 275-277, 2005.
3. Jump DB, Depner CM, and Tripathy S: Omega-3 fatty acid supplementation and cardiovascular disease. *Journal of Lipid Research* **53**(12): 2525-2545, 2012.
4. Valenzuela R, Sanhueza J and Valenzuela A: Global docosahexaenoic acid (DHA), an important fatty acid in aging and the protection of neurodegenerative diseases. *Journal of Nutritional Therapeutics* **1**(1): 63-72, 2012.
5. Goyens PL, Spilker ME, Zock PL, *et al.*: Compartmental modeling to quantify alpha-linolenic acid conversion after longer term intake of multiple tracer boluses. *Journal of Lipid Research* **46**(7): 1474-1483, 2005.
6. Global recommendations for EPA and DHA intake. <http://www.goedomega3.com/>, September 24, 2014.
7. Stark KD, Van Elswyk ME, Higgins MR, *et al.*: Global survey of the omega-3 fatty acids, docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid in the blood stream of healthy adults. *Progress in Lipid Research* **63**: 132-152, 2016.
8. 厚生労働省 日本人の食事摂取基準 平成21年5月29日, <https://www.mhlw.go.jp/shingi/2009/05/s0529-4.html>, September 24, 2018.
9. 文部科学省食品成分データベース <https://fooddb.mext.go.jp/ranking/ranking.html>, September 24, 2018 をもとに算出した
10. 水産物の需給動向 水産庁 水産白書 平成23年度 http://www.jfa.maff.go.jp/j/kikaku/wpaper/h23_h/trend/1/t1_2_1_1.html, September 24, 2018.
11. Oken E, Choi AL, Karagas MR, *et al.*: Which fish should I eat? Perspectives influencing fish consumption

- choices. *Environmental Health Perspectives* **120**(6): 790-798, 2012.
12. Ratledge C: Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *Biochimie* **86**(11): 807-815, 2004.
 13. Winwood RJ: Recent developments in the commercial production of DHA and EPA rich oils from micro-algae. *OCL* **20**(6): D604, 2013.
 14. Xie D, Jackson EN, and Zhu Q: Sustainable source of omega-3 eicosapentaenoic acid from metabolically engineered *Yarrowia lipolytica*: from fundamental research to commercial production. *Applied Microbiology and Biotechnology* **99**(4): 1599-1610, 2015.
 15. Walsh TA, Bevan SA, Gachotte DJ, *et al.*: Canola engineered with a microalgal polyketide synthase-like system produces oil enriched in docosahexaenoic acid. *Nature Biotechnology* **34**(8): 881-887, 2016.
 16. Usher S, Haslam RP, Ruiz-Lopez N, *et al.*: Field trial evaluation of the accumulation of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids in transgenic *Camelina sativa*: Making fish oil substitutes in plants. *Metabolic Engineering Communications* **2**: 93-98. eCollection 2015.
 17. Finco AMO, Mamani LDG, Carvalho JC, *et al.*: Technological trends and market perspectives for production of microbial oils rich in omega-3. *Critical Reviews in Biotechnology*, **37**(5): 656-671, 2017.
 18. Lee JM, Lee H, Kang SB, *et al.*: Fatty acid desaturases, polyunsaturated fatty acid regulation, and biotechnological advances. *Nutrients* **8**(1): 1-13, 2016.
 19. Fuller R: Probiotics in man and animals. *The Journal of Applied Bacteriology* **66**(5): 365-378, 1989.
 20. Fijan S: Microorganisms with claimed probiotic properties: An overview of recent literature. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **11**(5): 4745-4767, 2014.
 21. Ochsenreither K, Glück C, Stressler T, *et al.*: Production strategies and applications of microbial single cell oils. *Frontiers in Microbiology* **7**: Article 1539, 2016.
 22. Raghukumar, S: Thraustochytrid marine protists: Production of PUFAs and other emerging technologies. *Marine Biotechnology* (New York, NY) **10**(6): 631-640, 2008.
 23. Hulatt CJ, Wijffels RH, Bolla S, *et al.*: Production of fatty acids and protein by *Nannochloropsis* in flat-plate photobioreactors. *PLoS One* **12**(1): e0170440, 2017.
 24. Mendes A, Reis A, Vasconcelos R, *et al.*: *Cryptocodium cohnii* with emphasis on DHA production: A review. *Journal of Applied Phycology* **21**(2): 199-214, 2009.
 25. Allemann MN and Allen EE: Characterization and application of marine microbial omega-3 polyunsaturated fatty acid synthesis. *Methods in Enzymology* **605**: 3-32, 2018.
 26. Kurosawa K, Boccazzi P, de Almeida NM, *et al.*: High-cell-density batch fermentation of *Rhodococcus opacus* PD630 using a high glucose concentration for triacylglycerol production. *Journal of Biotechnology* **147**(3-4): 212-218, 2010.
 27. Yazawa K, Araki N, Okazaki K, *et al.*: Production of eicosapentaenoic acid by marine bacteria. *Journal of Biochemistry* (Tokyo) **103**(1): 5-7, 1988.
 28. Hirota K, Nodasaka Y, Orikasa Y, *et al.*: *Shewanella pneumatophori* sp. nov., an eicosapentaenoic acid-producing marine bacterium isolated from the intestines of Pacific mackerel (*Pneumatophorus japonicus*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**(Pt 6): 2355-2359, 2005.
 29. 渡部和郎, 矢澤一良: 海洋細菌による EPA の生産とその酵素系. *油化学* **42**(4): 278-285, 1993.
 30. Yazawa K: Production of eicosapentaenoic acid from marine bacteria. *Lipids* **31**(1): S297-S300, 1996.
 31. Orikasa Y, Yamada A, Yu R, *et al.*: Characterization of the eicosapentaenoic acid biosynthesis gene cluster from *Shewanella* sp. strain SCRC-2738. *Cellular and Molecular Biology* (Noisy-le-grand) **50**(5): 625-630, 2004.
 32. Allen EE and Bartlett DH: Structure and regulation of the omega-3 polyunsaturated fatty acid synthase genes from the deep-sea bacterium *Photobacterium profundum* strain SS9. *Microbiology* **148**(6): 1903-1913, 2002.
 33. Kawamoto J, Kurihara T, Yamamoto K, *et al.*: Eicosapentaenoic acid plays a beneficial role in membrane organization and cell division of a cold-adapted bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10. *Journal of Bacteriology* **191**(2): 632-640, 2009.

34. Tanaka M, Ueno A, Kawasaki K, *et al.*: Isolation of clustered genes that are notably homologous to the eicosapentaenoic acid biosynthesis gene cluster from the docosahexaenoic acid-producing bacterium *Vibrio marinus* strain MP-1. *Biotechnology Letters* **21**(11): 939-945, 1999.
35. Amiri-Jami M and Griffiths MW: Recombinant production of omega-3 fatty acids in *Escherichia coli* using a gene cluster isolated from *Shewanella baltica* MAC1. *Journal of Applied and Microbiology* **109**(6):1897-905, 2010.
36. Peng YF, Chen WC, Xiao K, *et al.*: DHA Production in *Escherichia coli* by expressing reconstituted key genes of polyketide synthase pathway from marine bacteria. *PLoS One* **11**(9): e0162861, 2016.
37. Metz JG, Roessler P, Facciotti D, *et al.*: Production of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthases in both prokaryotes and eukaryotes. *Science* (New York, NY) **293**(5528): 290-293, 2001.
38. Hayashi S, Satoh Y, Ujihara T, *et al.*: Enhanced production of polyunsaturated fatty acids by enzyme engineering of tandem acyl carrier proteins. *Scientific Reports* **6**: 35441, 2016.
39. Nishida T, Orikasa Y, Ito Y, *et al.*: *Escherichia coli* engineered to produce eicosapentaenoic acid becomes resistant against oxidative damages. *FEBS Letters* **580**(11): 2731-2735, 2006.
40. Nishida T, Orikasa Y, Watanabe K, *et al.*: The cell membrane-shielding function of eicosapentaenoic acid for *Escherichia coli* against exogenously added hydrogen peroxide. *FEBS Letters* **580**(28-29): 6690-6694, 2006.
41. Hori R, Nishida T, and Okuyama H: Hydrophilic and hydrophobic compounds antithetically affect the growth of eicosapentaenoic acid-synthesizing *Escherichia coli* recombinants. *The Open Microbiology Journal* **5**: 114-118, 2011.
42. Nishida T, Morita N, Yano Y, *et al.*: The antioxidative function of eicosapentaenoic acid in a marine bacterium, *Shewanella marintestina* IK-1. *FEBS Letters* **581**(22): 4212-4216, 2007.
43. Nishida T, Hori R, Morita N, *et al.*: Membrane eicosapentaenoic acid is involved in the hydrophobicity of bacterial cells and affects the entry of hydrophilic and hydrophobic compounds. *FEMS Microbiology Letters* **306**(2): 91-96, 2010.
44. Kawamoto J, Sato T, Nakasone K, *et al.*: Favourable effects of eicosapentaenoic acid on the late step of the cell division in a piezophilic bacterium, *Shewanella violacea* DSS12, at high-hydrostatic pressures. *Environmental Microbiology* **13**(8): 2293-2298, 2011.
45. Wang F, Xiao X, Ou HY, *et al.*: Role and regulation of fatty acid biosynthesis in the response of *Shewanella piezotolerans* WP3 to different temperatures and pressures. *Journal of Bacteriology* **191**(8): 2574-2584, 2009.
46. Dai X-Z, Kawamoto J, Sato SB, *et al.*: Eicosapentaenoic acid facilitates the folding of an outer membrane protein of the psychrotrophic bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **425**(2): 363-367, 2012.
47. Sato S, Kawamoto J, Sato SB, *et al.*: Occurrence of a bacterial membrane microdomain at the cell division site enriched in phospholipids with polyunsaturated hydrocarbon chains. *The Journal of Biological Chemistry* **287**(29): 24113-24121, 2012.
48. Orikasa Y, Tanaka M, Sugihara S, *et al.*: *pfaB* products determine the molecular species produced in bacterial polyunsaturated fatty acid biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters* **295**(2): 170-176, 2009.
49. Amiri-Jami M, Lapointe G, and Griffiths MW: Engineering of EPA/DHA omega-3 fatty acid production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *Applied Microbiology and Biotechnology* **98**(7): 3071-3080, 2014.
50. Amiri-Jami M, Abdelhamid AG, Hazaa M, *et al.*: Recombinant production of omega-3 fatty acids by probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917. *FEMS Microbiology Letters* **362**(20): fnv166, 2015.
51. Hill PJ, Stritzker J, Scadeng M, *et al.*: Magnetic resonance imaging of tumors colonized with bacterial ferritin-expressing *Escherichia coli*. *PLoS One* **6**(10): e25409, 2011.
52. Sonnenborn U: *Escherichia coli* strain Nissle 1917—from bench to bedside and back: history of a special *Escherichia coli* strain with probiotic properties. *FEMS Microbiology Letters* **363**(19): fnw212, 2016.
53. Troge A, Scheppach W, Schroeder BO, *et al.*: More than a marine propeller—the flagellum of the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 is the major adhesin mediating binding to human mucus. *International of Medical Microbiology* **302**(7-8): 304-314, 2012.

54. Altenhoefer A, Oswald S, Sonnenborn U, *et al.*: The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 interferes with invasion of human intestinal epithelial cells by different enteroinvasive bacterial pathogens. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **40**(3): 223-229, 2004.
55. Westendorf AM, Gunzer F, Deppenmeier S, *et al.*: Intestinal immunity of *Escherichia coli* NISSLE 1917: a safe carrier for therapeutic molecules. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **43**(3): 373-384, 2005.
56. Lee S-J, Kim CH, Seo P-S, *et al.*: Enhancement of heterologous production of eicosapentaenoic acid in *Escherichia coli* by substitution of promoter sequences within the biosynthesis gene cluster. *Biotechnology Letters* **30**(12): 2139-2142, 2008.
57. Orikasa Y, Ito Y, Nishida N, *et al.*: Enhanced heterologous production of eicosapentaenoic acid in *Escherichia coli* cells that co-express eicosapentaenoic acid biosynthesis *pfa* genes and foreign DNA fragments including a high-performance catalase gene, *vktA*. *Biotechnology Letters* **29**(5): 803-809, 2007.
58. Hamamoto T, Takata N, Kudo T, *et al.*: Characteristic presence of polyunsaturated fatty acids in marine psychrophilic vibrios. *FEMS Microbiology Letters* **129**(1): 51-59, 1995.
59. Sugihara S, Mohd Taha AIBH, Motoigi T, *et al.*: *Shewanella oshoroensis* sp. nov.: A mesophilic eicosapentaenoic acid and hentriacontanoic acid-producing bacterium. *Research Journal of Microbiology* **7**(2): 131-138, 2012.
60. Sugihara S, Hori R, Nakanowatari H, *et al.*: Possible biosynthetic pathways for all *cis*-3, 6, 9, 12, 15, 19, 22, 25, 28-hentriacontanoic acid in bacteria. *Lipids* **45**(2): 167-177, 2010.
61. 杉原慎二：海洋細菌における多価不飽和脂質の分布，機能及び生合成．北海道大学大学院環境科学院平成21年度修士論文 2010年3月
62. Shulse CN and Allen EE: Diversity and distribution of microbial long-chain fatty acid biosynthetic genes in the marine environment. *Environmental Microbiology* **13**(3): 684-695, 2011.
63. Cowell RR and Morita RY: Reisolation and emendation of description of *Vibrio marinus* (Ressell) Ford. *Journal of Bacteriology* **88**(4): 831-837, 1964.
64. Bowman JP, Gosink JJ, McCammon SA, *et al.*: *Colwellia demingiae* sp. nov., *Colwellia hornerae* sp. nov., *Colwellia rossensis* sp. nov. and *Colwellia psychrotropica* sp. nov.: psychrophilic Antarctic species with the ability to synthesize docosahexaenoic acid (22:6 ω 3). *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**: 1171-1180, 1998.
65. Orikasa Y, Nishida T, Yamada A, *et al.*: Recombinant production of docosahexaenoic acid in a polyketide biosynthesis mode in *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters* **28**(22): 1841-1847, 2006.
66. 田岡洋介，長野直樹，林雅弘他：高度不飽和脂肪酸の製造方法 特開2010-094111
67. Seo EJ, Weibel S, Wehkamp J, *et al.*: Construction of recombinant *E. coli* Nissle 1917 (EcN) strains for the expression and secretion of defensins. *International Journal of Medical Microbiology* **302**(6): 276-287, 2012.
68. Miller JK, Harrison MT, D'Andrea A, *et al.*: β -Carotene biosynthesis in probiotic bacteria. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* **5**(2): 69-80, 2013.
69. Wassef L, Wirawan R, Chikindas M, *et al.*: β -Carotene-producing bacteria residing in the intestine provide vitamin A to mouse tissues *in vivo*. *The Journal of Nutrition* **144**(5): 608-613, 2014.
70. Yu R, Yamada A, Watanabe K, *et al.*: Production of eicosapentaenoic acid by a recombinant marine cyanobacterium, *Synechococcus* sp. *Lipids* **35**(10): 1061-1064, 2000.
71. Takeyama H, Takeda D, Yazawa K, *et al.*: Expression of the eicosapentaenoic acid synthesis gene cluster from *Shewanella* sp. in a transgenic marine cyanobacterium, *Synechococcus* sp. *Microbiology* **143**(Pt 8): 2725-2731, 1997.
72. Yoshino T, Kakunaka N, Liang Y, *et al.*: Production of ω 3 fatty acids in marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain NKBG 15041c via genetic engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology* **101**(18): 6899-6905, 2017.
73. Matsumoto A, Kasai H, Matsuo Y, *et al.*: *Ilumatobacter nonamiense* sp. nov. and *Ilumatobacter coccineum* sp. nov., isolated from seashore sand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **63**(Pt 9): 3404-3408, 2013.
74. Fujinami S, Takarada H, Kasai H, *et al.*: Complete genome sequence of *Ilumatobacter coccineum* YM16-304^T. *Standards in Genomic Sciences* **8**(3): 430-440, 2013.
75. Fan Y: Research on the stability of the recombinant production of omega-3 fatty acids in industrial strains using

- the gene cluster isolated from *Shewanella baltica* MAC1. A Thesis presented to The University of Guelph, Guelph, Canada. December 2015.
76. Blakie B: A thesis submitted for the degree of Master of Science at the University of Otago, Dunedin, New Zealand. April 2015.
 77. Nakano K, Rischke M, Sato S, *et al.*: Influence of acetic acid on the growth of *Escherichia coli* K12 during high-cell-density cultivation in a dialysis reactor. *Applied and Microbiological Biotechnology* **48**(5): 597-601, 1997.
 78. Okuyama H, Orikasa Y, Nishida T, *et al.*: Bacterial genes responsible for the biosynthesis of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids and their heterologous expression. *Applied and Environmental Microbiology* **73**(3): 665-670, 2007.
 79. Ootaki M, Morita N, Nishida T, *et al.*: Genes and pathways involved in biosynthesis of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in bacteria. *Advanced Researches of Plant Lipids*. Murata N, Nishida I, Yamada M, *et al.*; eds. Tokyo, Kluwer Academic Publishers, pp. 49-52, 2003.
-

連絡先：奥山 英登志
mail: hoku@ees.hokudai.ac.jp

渡部 和郎
株式会社ウイズウィグ
〒104-0032 東京都中央区八丁堀 2-21-2 コア京橋ビル 6階
<http://www.wysiwyg.co.jp>
mail: h3c14p32@outlook.jp

椎茸菌糸体培養培地抽出物 (LEM) 由来 水溶性リグニン画分 (JLS-18) の抗アレルギー効果

Anti-allergic effects of a water-soluble lignin rich fraction (JLS-18) prepared from the extract of culture medium of *Lentinus edodes* mycelia (LEM)

小早川 幸子 (KOHAYAKAWA Sachiko)¹ 神内 伸也 (KAMIUCHI Shinya)² 田口 雄也 (TAGUCHI Yuya)²
立野 良治 (TATENNO Yoshiharu)¹ 岩田 直洋 (IWATA Naohiro)² 飯塚 博 (IIZUKA Hiroshi)¹
日比野 康英 (HIBINO Yasuhide)^{2,*}

¹ 野田食菌工業株式会社, ² 城西大学大学院 薬学研究科

Key Words : 椎茸菌糸体培養培地抽出物 (LEM) リグニン 脱顆粒抑制 抗アレルギー効果

Anti-allergic effects of a water-soluble lignin rich fraction (JLS-18) prepared from the extract of culture medium of *Lentinus edodes* mycelia (LEM)

Sachiko Kohayakawa¹, Shinya Kamiuchi², Yuya Taguchi², Yoshiharu Tateno¹, Naohiro Iwata², Hiroshi Iizuka¹, Yasuhide Hibino^{2,*}

¹ Noda Shokukinkogyo Co. Ltd., 295 Nanakohdai, Noda, Chiba 278-0051

² Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Josai University,
1-1 Keyakidai, Sakado, Saitama 350-0295

[Key words: Water-soluble extract from culture medium of *Lentinus edodes* mycelia (LEM), Lignin, Suppression of degranulation, Anti-allergic effect]

Abstract

A water-soluble extract from culture medium of *Lentinus edodes* mycelia (LEM) has long been used as a healthy food and now it has been shown to have antioxidant, cholesterol-lowering, antiviral, hypoglycemic, immunostimulatory and antitumor activities. LEM includes many components such as polysaccharides, proteins, water soluble lignin, dietary fiber and minerals. Among them, water soluble lignin has been shown to have immunostimulatory activity. In this study, we examined the anti-allergic effect of LEM and its water soluble lignin fraction, JLS-18. As a result, LEM and JLS-18 suppressed the release of β -hexosaminidase and inhibited hyaluronidase activity. These results show that LEM is effective against type 1 allergy, suggesting that water soluble lignin, which is a unique component of LEM, strongly exerts anti-allergic activity.

*To whom correspondence should be addressed.

Department of Clinical Dietetics and Human Nutrition,
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Josai University,
1-1 Keyakidai Sakado, Saitama 350-0295, Japan
TEL : +81-49-271-7285 FAX : +81-49-271-7284 E-mail : seitaib@josai.ac.jp

要旨

椎茸菌糸体培養培地抽出物 (LEM) は、健康食品として長年の食経験がある。LEM には椎茸の菌糸体成分に加えて、 β -グルカンやテルペン、水溶性リグニンなどの菌糸体による固形培地の分解物や菌糸体の自己消化物が含まれているため、椎茸には認められない生理活性を併せ持つと考えられている。本研究では、LEM およびその水溶性リグニン画分 (JLS-18) の肥満細胞からの脱顆粒抑制作用とヒアルロニダーゼ阻害活性について検討し、I 型アレルギーに対する有効性について調査した。その結果、LEM は脱顆粒抑制作用とヒアルロニダーゼ阻害作用を示し、特に、LEM に含まれる水溶性リグニンが抗アレルギー作用を強く発揮するから、I 型アレルギー反応を抑制する有効な健康食品であると考えられた。

はじめに

近年、様々な食用キノコの生理活性が注目され、これらを原材料とした多くの健康食品が開発されている。椎茸菌糸体培養培地抽出物 (LEM) は、椎茸菌糸体を固形培地に接種し、子実体発生直前に培地ごと粉碎して熱水抽出および噴霧乾燥したものであり、健康食品として長年の食経験がある。その成分は、椎茸の菌糸体成分に加えて、 β -グルカンやテルペン、水溶性リグニンなどの菌糸体による固形培地の分解物や菌糸体の自己消化物が含まれているため、椎茸には認められない生理活性を示すと考えられている。これまでに、LEM は抗ウイルス作用^{1,2)}、抗腫瘍作用^{3,4)}、免疫調節作用^{5,6)}、NO 産生抑制作用²⁾、肝保護作用⁷⁻⁹⁾、抗酸化作用^{10,11)} など様々な生理作用が報告されている。

現在、アレルギー疾患の患者数は増加の傾向にあり、平成 26 年の総患者数は、喘息が 117.7 万人、アレルギー性鼻炎が 66.3 万人、アトピー性皮膚炎が 45.6 万人、結膜炎が 27.8 万人との調査結果がある¹²⁾。治療法は対症療法が中心であり、容易に完治する方法は確立されていない。花粉症などの I 型アレルギーの発症を抑えるには、抗原である花粉の曝露を可能な限り少なくして、IgE 抗体の産生を抑えることが重要である。一方、肥満細胞の脱顆粒を抑制することがアレルギー反応を減弱させる方法であると考えられる。

本研究では、LEM およびその水溶性リグニン画分 (JLS-18) による肥満細胞の脱顆粒抑制作用とヒアルロニダーゼ阻害活性について検討し、I 型アレルギーに対する有効性について考察した。

1. 実験材料および方法

1-1. 実験材料

本研究では、野田食菌工業 (株) において製造された「LEM」を使用した。椎茸菌糸体ペレットをバガス (砂糖キビ搾汁残渣) と脱脂した米糠の混合固形培地に接種し、約 3.5 ヶ月間培養後、子実体発生直前に培地ごと破碎し、蒸留水で懸濁、熱水抽出した。抽出物を珪藻土で濾過した後、メンブランフィルター (0.45 μ m) にて濾過滅菌し、濾液の噴霧乾燥品を LEM とした。

1-2. JLS-18 の調製

JLS-18 は以下のように調製した¹⁾。LEM を限外ろ過 (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) により 3 つに分画した。そのうち、分子量が $3 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ ダルトンの画分を分取した。続いて疎水性カラムクロマトグラフィー (Octyl-Cellulofine, Seikagaku Kogyo Co., Tokyo, Japan) を用いてさらに精製した。分取した画分に等量の 2 M 硫酸アンモニウムを含む 0.5 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) を加えた後、カラムに充填した。結合緩衝液 (1 M リン酸アンモニウム含有 0.25 M リン酸緩衝液) で洗浄し、0.4 M 硫酸アンモ

ニウム含有 0.1 M リン酸緩衝液, 次いで水で分離した。水画分を脱塩し, 凍結乾燥したサンプルを JLS-18 とした。

1-3. 細胞

ラット好塩基球様細胞株 RBL-2H3 (以下 RBL-2H3) は, (独) 医薬基盤研究所培養資源研究室・JCRB 細胞バンクより購入した。10% 牛胎仔血清 (FBS, Cell Culture Bioscience, Tokyo, Japan) を含む DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Invitrogen, Carlsbad, CA) 培養液で 37°C, 5% CO₂ 条件下で培養した。

1-4. 脱顆粒抑制試験

脱顆粒抑制能は, β -hexosaminidase の放出阻害活性で評価した^{13, 14)}。RBL-2H3 細胞を 96 well plate (BD Falcon, Bedford, MA) に 2×10^4 cells/well で播種し, 一晚培養した。続いて, LEM および JLS-18 もしくは陽性対照としてクロモグリク酸ナトリウム溶液 100 μ L を添加し, 37°C で 30 分間インキュベートした。また, 甜茶抽出液, ベにふうき粉末抽出液, レモンバーム抽出物 (以上, NIPPON FUNMATSU YAKUHIN Co., Osaka, Japan) およびコントロールとして Modified Tyrode (MT) buffer (137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 1.8 mmol/L CaCl₂, 1 mmol/L MgCl₂, 5.6 mmol/L glucose, 20 mmol/L HEPES, 0.1% BSA, pH 6.8) を添加し反応させた。その後, 脱顆粒剤である Compound 48/80 [1 mg/mL; Sigma, St. Louis, MO] を 50 μ L/well 加え, 37°C で 4 時間インキュベートした。インキュベート後, 氷冷して反応を停止させ, 培養上清を回収した。また, 残った細胞に細胞溶解液 [20 mmol/L Tris (pH 7.4), 200 mmol/L NaCl, 2.5 mmol/L MgCl₂, 0.05% NP-40] 100 μ L/well を加え, 37°C で 10 分間インキュベートし 2 細胞を溶解した。続いて上記の培養上清 (supernatant) および溶解した細胞液 (cell lysate) それぞれ 50 μ L を 96 well plate に移し, 37°C で 5 分間加温後, 基質溶液 [0.1 mol/L citrate buffer (pH 4.5) に溶解した 3.3 mmol/L *p*-nitrophenyl-2-acetoamido-2-deoxy- β -D-glucopyranoside (Wako Pure Chemical, Osaka, Japan)] を 50 μ L/well 加え, 37°C で 25

分間インキュベートした。反応溶液に 2.0 mol/L glycine buffer (pH 10.4) を 50 μ L/well 加えて反応を停止した。一方で, 同様に培養上清および溶解した細胞液それぞれ 50 μ L に glycine buffer を 50 μ L/well 加え, 37°C で 25 分間インキュベートした後, 基質溶液を 50 μ L/well 加えて反応させた。反応終了後, マイクロプレートリーダーを用いて 405 nm の吸光度 (Abs) を測定し, 以下の計算式から脱顆粒の指標となる β -hexosaminidase の放出率を算出した。

$$\beta\text{-hexosaminidase release (\%)} = 100 \times \frac{(\text{Abs supernatant} - \text{Abs blank of supernatant})}{\{(\text{Abs supernatant} - \text{Abs blank of supernatant}) + (\text{Abs cell lysate} - \text{Abs blank of cell lysate})\}}$$

試料の代わりに MT buffer のみを添加したコントロールの β -hexosaminidase 放出率を 100% として, 試料の β -hexosaminidase 放出抑制活性を算出した。

1-5. ヒアルロニダーゼ阻害活性測定試験

ヒアルロニダーゼ阻害活性は, Morgen-Elson 法に従って行った¹⁵⁾。試料を酢酸緩衝液 (pH 4.0, 0.1 M) で溶解・希釈し, 0.2 mL ずつ分注した (酵素反応用およびブランク用)。因みに, 酢酸緩衝液のみを加えたものを対照とした。その後, 酵素液として Hyaluronidase Type IV-S (Sigma) 3.8 mg を 2 mL の酢酸緩衝液に溶解したものを 0.1 mL 加え混和し, 37°C で 20 分間インキュベートした (ブランクには酢酸緩衝液のみを加えた)。酵素活性化剤として 2.5 mg の Compound 48/80 (Sigma) を 5 mL の酢酸緩衝液で溶解したものを使用した。この溶液を 0.2 mL ずつ添加し, 37°C で 20 分間インキュベートした。その後, 16 mg のヒアルロン酸ナトリウム (Wako Pure Chemical) を 20 mL の酢酸緩衝液で溶解したものを基質溶液とし, 0.5 mL ずつ加え 37°C で 40 分間インキュベートした。その後, 0.4N NaOH 溶液を 0.2 mL 添加し, 反応を停止させ, 沸騰水浴中で 3 分間煮沸し, 酵素を失活させた。続いて, 5 g の *p*-DAB (*p*-dimethylaminobenzaldehyde, Wako Pure Chemical) に 44 mL の酢酸を加え溶解し,

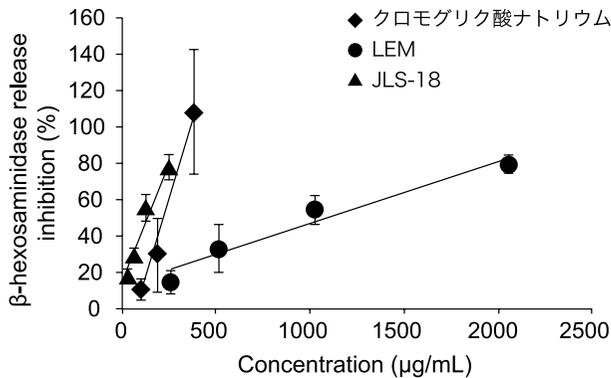


図1 LEMの脱顆粒抑制効果

RBL-2H3細胞を用いてLEM, JLS-18およびクロモグリク酸ナトリウムのβ-hexosaminidase放出抑制率を調査した。

10N HClを6 mL添加したp-DAB溶液を6 mL加え、37°Cで20分間インキュベートした。反応後、分光光度計を用いて585 nmの吸光度を測定し、以下の計算式からヒアルロニダーゼ活性阻害率(%)を算出した。

$$\text{ヒアルロニダーゼ活性阻害率(\%)} = [(A - B) - (C - D)] / (A - B) \times 100$$

[A: 対照の585 nmにおける吸光度, B: 対照のブランクの吸光度, C: 試料の585 nmにおける吸光度, D: 試料のブランクの吸光度]

2. 結果

2-1. LEMの脱顆粒抑制効果

肥満細胞は、細胞表面のFc受容体に結合したIgEが抗原と架橋することにより脱顆粒を誘発する。β-hexosaminidaseは、肥満細胞の顆粒中に豊富に存在し、肥満細胞が活性化されると化学伝達物質とともに放出されることから、肥満細胞の脱顆粒の指標となる。本実験では、Compound 48/80を用いてRBL-2H3から放出されるβ-hexosaminidase放出抑制率を算出した(図1)。その結果、化学伝達物質遊離抑制薬であるクロモグリク酸ナトリウムを加えた陽性対照では95, 191, 381 µg/mL処理時の放出抑制率が、そ

れぞれ10.7, 29.7, 108.2%であった。一方、LEMでは257, 514, 1028, 2055 µg/mLにおいて、それぞれ14.8, 33.1, 54.7, 79.4%の放出抑制を示した。さらに、JLS-18では、31.3, 62.5, 125, 250 µg/mLにおいて、それぞれ18.4, 30.5, 55.1, 77.6%の放出抑制を示し、その効果はクロモグリク酸ナトリウムとほぼ同等であった。

2-2. β-hexosaminidase放出率50%阻害濃度の比較

LEMおよびJLS-18においてβ-hexosaminidase放出率の50%阻害濃度(IC₅₀)を、抗アレルギー作用が報告されている甜茶抽出液、ペニフウキ粉末抽出液、レモンバーム抽出物と比較した(図2)。その結果、クロモグリク酸ナトリウムのIC₅₀が235 µg/mLに対して、LEMでは1096 µg/mL, JLS-18では132 µg/mLであった。また、甜茶抽出液、ペニフウキ粉末抽出液、レモンバーム抽出物では、それぞれ467, 1199, 334 µg/mLであった。

2-3. LEMのヒアルロニダーゼ阻害効果

ヒスタミンの放出に関与するヒアルロニダー

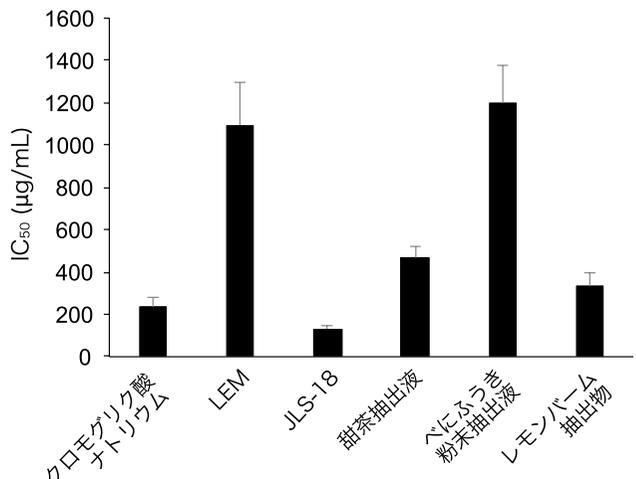


図2 β-hexosaminidase放出率50%阻害濃度の比較

クロモグリク酸ナトリウムおよび、LEM, JLS-18, 甜茶抽出液、ペニフウキ粉末抽出液、レモンバーム抽出物のβ-hexosaminidase放出率のIC₅₀値を比較した。

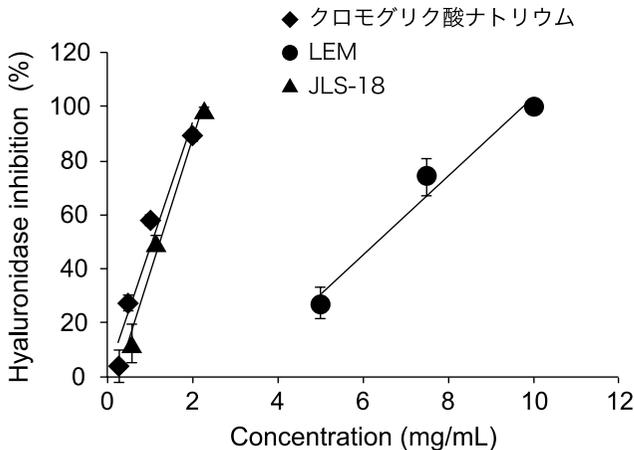


図3 LEMのヒアルロニダーゼ阻害効果

LEM, JLS-18または酢酸緩衝液のみ(コントロール群)を入れた試験管に、ヒアルロニダーゼ, Compound 48/80を加え、処理した。585 nmの吸光度を測定してヒアルロニダーゼ活性阻害率(%)を算出した。

ゼの阻害活性について検討した(図3)。クロモグリク酸ナトリウム0.5, 1, 2 mg/mL処理では、それぞれ27.3, 58.0, 89.2%の阻害活性を示したのに対して、LEMでは5, 7.5, 10 mg/mLにおいてそれぞれ27.4, 74.0, 100%であった。さらに、JLS-18では、0.56, 1.13, 2.25 mg/mLでそれぞれ12.3, 49.6, 98.6%と陽性対照のクロモグリク酸ナトリウムとほぼ同等の阻害作用を示した。

3. 考察

I型アレルギー反応は、肥満細胞が脱顆粒を生じ、ヒスタミンなどの化学伝達物質を放出することにより進行する。 β -hexosaminidaseは、顆粒中に豊富に存在し化学伝達物質とともに脱顆粒時に放出されることから、これを指標に脱顆粒抑制効果を判定することができる。LEMは、濃度依存的に放出抑制を示すことから、抗アレルギー作用を有すると考えられた。さらに、LEMの水溶性リグニン画分であるJLS-18では、クロモグリク酸ナトリウムとほぼ同等の放出抑制を示したことから、LEMに含有する水溶性リグニンが抗アレルギー作用を有するものと考えられた。これまでに、複数の食品、食

品成分が抗アレルギー作用を有することが知られており、「甜茶」に含まれる甜茶ポリフェノールは、ヒスタミンの放出を抑制するとの報告がある¹⁶⁾。また、「べにふうき」に含まれるメチル化カテキンや、「レモンバーム」に含まれるポリフェノール化合物のロズマリン酸が抗アレルギー作用を有していることが明らかにされている^{17, 18)}。その他にも、「シソの葉」に含まれるロズマリン酸、ルテオリン、アピゲニン、 α -リノレン酸のフェノール類や、「エゾウコギ」に含まれるクロロゲン酸、「ベニバナ」に含まれるフラボノイドにおいても、肥満細胞の脱顆粒を抑制し抗アレルギー効果を示すことが明らかとなっている¹⁸⁻²¹⁾。今回、我々は、甜茶

抽出液、べにふうき粉末抽出液、レモンバーム抽出物の β -hexosaminidaseの放出抑制能についてIC₅₀をLEMと比較した結果、べにふうき粉末抽出液とほぼ同等の効果を示す一方で、LEM抽出画分のJLS-18は、甜茶抽出液、レモンバーム抽出物に比べて強い抑制効果を示し、その効果はクロモグリク酸ナトリウムとほぼ同等であった。

続いて、LEMおよびJLS-18のヒアルロニダーゼ阻害作用について検討した。LEMは、濃度依存的にヒアルロニダーゼの活性を阻害するものの、その効果は弱いものであった。しかし、JLS-18は、クロモグリク酸ナトリウムとほぼ同等の阻害作用を示した。LEMより抽出・分離されたJLS-18は、75%が水溶性リグニンであることから、LEMの阻害活性の本体は水溶性リグニンの可能性が強く示唆された。

肥満細胞を用いた脱顆粒抑制および、ヒアルロニダーゼ阻害活性はともにアレルギー反応の抑制と正の相関関係にあり、I型アレルギーに対して抑制効果を評価する適切な方法である。今回、LEMはどちらの方法においても効果を示すこと、さらに、LEMに含有する水溶性リグニンが、抗アレルギー作用を強く発揮してい

ることが明らかとなり、LEMがI型アレルギー反応を抑制する有効な健康食品であると考えられた。今後、水溶性リグニンを主成分とする

JLS-18の健康食品としての利用に向けて、毒性評価を併せて検討していく必要がある。

参考文献

1. Yamamoto Y., Shirono H., Kono K., *et al.*: Immunopotentiating activity of the water-soluble lignin rich fraction prepared from LEM: the extract of the solid culture medium of *Lentinus edodes* mycelia. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**(11): 1909-1912, 1997.
2. Kawano M., Thet MM., Makino T., *et al.*: DNA microarray analysis of signaling pathway in macrophages stimulated by lignin-carbohydrate complex from *Lentinus edodes* mycelia (LEM) extract. *Anticancer Res.* **30**(7): 2567-2576, 2010.
3. Hibino Y., Konishi Y., Koike J., *et al.*: Productions of interferon-gamma and nitrite are induced in mouse splenic cells by a heteroglycan-protein fraction from culture medium of *Lentinus edodes* mycelia. *Immunopharmacology* **28**(1): 77-85, 1994.
4. Morinaga H., Tazawa K., Tagoh H., *et al.*: An *in vivo* study of hepatic and splenic interleukin-1 beta mRNA expression following oral PSK or LEM administration. *Jpn. J. Cancer Res.* **85**(12): 1298-1303, 1994.
5. Kojima H., Akaki J., Nakajima S., *et al.*: Structural analysis of glycogen-like polysaccharides having macrophage-activating activity in extracts of *Lentinula edodes* mycelia. *J. Nat. Med.* **64**(1): 16-23, 2010.
6. Shen J., Tanida M., Fujisaki Y., *et al.*: Effect of the culture extract of *Lentinus edodes* mycelia on splenic sympathetic activity and cancer cell proliferation. *Auton Neurosci.* **145**(1-2): 50-54, 2009.
7. Xuan M., Okazaki M., Iwata N., *et al.*: Protective effects of a water-soluble extract from culture medium of *Lentinus edodes* mycelia against neuronal damage after hypoxia-ischemia in mice. *Jpn. J. Comp. Alter. Med.* **8**(2): 99-107, 2011.
8. 寺田弘, 大原豊実, 山口康代ら: 椎茸菌糸体抽出物の四塩化炭素肝障害に対する防御効果. 新薬と臨床. **50**(7): 655-664, 2001.
9. Xuan M., Iwata N., Okazaki M., *et al.*: Cerebroprotective effects of a water-soluble extract from the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia. *New Food Indust.* **59**(8): 1-14, 2017.
10. 織田真智子, 大島佳奈, 東野英明ら: 脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット (SHRSP) に対する椎茸菌糸体抽出物の作用. 新薬と臨床. **52**(1120): 52-60, 2003.
11. 中村リサ, 渡邊愛子, 猪木彩子ら: 生体内脂質過酸化に及ぼすシイタケ菌糸体抽出物 (L.E.M.) の影響. 日本栄養・食糧学会誌. **58**(4): 217-223, 2005.
12. アレルギー疾患対策に関する状況の調査 (結果報告): 厚生労働省健康局がん・疾病対策課, 平成 28 年
13. Onishi S., Nishi K., Yasunaga S., *et al.*: Nobiletin, a polymethoxy flavonoid, exerts anti-allergic effect by suppressing activation of phosphoinositide 3-kinase. *Journal of functional foods.* **6**(1): 606- 614, 2014.
14. 堀籠悟, 吉田泉, 玉木千穂ら: RBL-2H3 細胞を用いた食品成分の脱顆粒抑制作用 簡易スクリーニング法. 日本食品科学工学会誌. **55**(11): 535- 540, 2008.
15. 前田有美恵, 増井俊夫, 杉山清ら: 茶抽出液の Hyaluronidase 阻害活性. 食品衛生学雑誌. **31**(3): 233-237, 1990.
16. 石倉義之, 諏訪芳秀, 岡田力ら: 甜茶 (*rubus suavissimus*) エキスの抗炎症効果. 炎症. **15**(2): 167-173, 1995.
17. Maeda-Yamamoto M., Ema K., Monobe M., *et al.*: Epicatechin-3-O-(3''-O-methyl)-gallate content in various tea cultivars (*Camellia sinensis* L.) and its *in vitro* inhibitory effect on histamine release. *J. Agric. Food Chem.* **60**(9): 2165-2170, 2012.
18. Zhu F., Asada T., Sato A., *et al.*: Rosmarinic acid extract for antioxidant, antiallergic, and α -glucosidase inhibitory activities, isolated by supramolecular technique and solvent extraction form *Perilla* leaves. *J Agric Food Chem.*

62(4): 885-892, 2014.

19. Jeon JH., Kwon SC., Park D., *et al.*: Anti-allergic effects of white rose petal extract and anti-atopic properties of its hexane fraction. *Arch Pharm Res.* **32**(6): 823-830, 2009.
20. Komasa Y., Mizoguchi T., Kubota H., *et al.*: Anti-allergic effects of *Acanthopanax senticosus* root extract and *Perilla frutescens* seed extract. *Jpn. J. Compl. Alter. Med.* **1**(1): 95-101, 2004.
21. Toyoda M., Tanaka K., Hoshino K., *et al.*: Profiles of potentially antiallergic flavonoids in 27 kinds of health tea and green tea infusions. *J. Agric. Food Chem.* **45**(7): 2561-2564, 1997.

* 連絡先：日比野 康英

城西大学大学院薬学研究科 医薬栄養学専攻
〒350-0295 埼玉県坂戸市けやき台 1-1
Tel : 049-271-7285 Fax : 049-271-7284
E-mail : seitaib@josai.ac.jp

¹ 野田食菌工業株式会社
(278-0051 千葉県野田市七光台 295)
² 城西大学大学院 薬学研究科
(350-0295 埼玉県坂戸市けやき台 1-1)

ニジマス用飼料の炭水化物源－ 3

酒本 秀一 (SAKAMOTO Shuichi)

Key Words：ニジマス用飼料 炭水化物源 小麦粉 中白糠 大麦仕上糠 マイロ ライ麦 人工消化率 消化吸収率 飼料効率 タンパク質効率

養魚飼料の炭水化物源には一般的に飼料用小麦粉が用いられているが、中白糠（酒糠）の方がより優れた飼育成績を示すことをこれまでの試験^{1,2)}で明らかにした。しかしながら中白糠には価格と供給量の点でやや難が有る。そこで安価で、ある程度の量の供給が可能で、さらに小麦粉や中白糠と同等以上の効果を示す炭水化物源の有無をスクリーニングすることにした。また、そのままでは小麦粉や中白糠より劣っていても、簡単な加熱処理などを行うことによって効果が改善され、小麦粉や中白糠と同等の効果を示すようになる物の有無も調べた。

試験 -1. 飼育試験による比較

1. 材料と方法

1-1. 供試炭水化物源

小麦粉2種類（I，II），中白糠，大麦仕上糠2種類（I，II），マイロおよびライ麦の7種類を炭水化物源として用いた。小麦粉のI，IIはこれまでの試験で使用した物と同じで、Iは“フスマ”に近い低品質の飼料用小麦粉、IIは食品用に近い高品質の飼料用小麦粉である。

中白糠は従来用いてきた物の一つである。大麦仕上糠のI，IIは製造元が違う物である。大麦仕上糠，マイロ，ライ麦を簡単に説明すると以下の様になる。大麦を食糧用に精白する時に副産物として発生する物を総称して大麦糠といい、荒糠，仕上糠，混合糠などに区別されている。それらのうち仕上糠は可溶性無窒素物が最も高い画分である。マイロはイネ科の一年草の実で、昔はコーリヤンとも呼ばれた。国外での呼び名のソルガムといわれることも有る。食材として使われる他、シロップや酒の原料、飼料原料としても利用されている。ライ麦はイネ科の二年草の実で、クロムギ（黒麦）ともいわれ、黒パンや酒の原料となる他に家畜の飼料用としても利用されている。

表1に分析値を示す。タンパク質，脂質，灰分含量には可也の違いが有る。タンパク質は小麦粉が最も多く、次いで中白糠と大麦仕上糠で、

表1 供試炭水化物源の分析値

	小麦粉		中白糠	大麦仕上糠		マイロ	ライ麦
	I	II		I	II		
水分 (%)	11.5	13.2	13.3	10.8	13.5	13.4	12.6
タンパク質	17.8	16.2	13.9	11.8	13.9	10.7	10.4
脂質	4.4	1.6	0.7	2.6	4.0	3.1	1.5
灰分	3.3	0.8	1.7	2.0	2.8	1.3	1.6
炭水化物	57.9	62.1	65.3	62.4	58.3	60.7	57.7

表2 試験飼料の組成と分析値

試験区	A	B	C	D
魚粉 (%)	66	66	66	66
小麦粉 I	30			
小麦粉 II		30		
中白糠			30	
大麦仕上糠 I				30
ビタミン・ミネラル混合	4	4	4	4
水分 (%)	4.6	4.8	5.7	4.7
タンパク質	58.4	57.4	57.6	56.5
脂質	6.1	5.4	5.4	5.7
灰分	7.4	6.7	6.8	7.1
炭水化物	17.8	22.4	23.4	21.3
Cal/100g	324	323	326	320
C/P 比	5.55	5.63	5.66	5.66

試験区	E	F	G
魚粉 (%)	66	66	66
大麦仕上糠 II	30		
マイロ		30	
ライ麦			30
ビタミン・ミネラル混合	4	4	4
水分 (%)	4.8	4.5	3.9
タンパク質	57.2	58.9	56.9
脂質	6.0	6.4	5.3
灰分	7.0	7.4	7.0
炭水化物	23.5	16.5	21.9
Cal/100g	330	326	319
C/P 比	5.77	5.54	5.61

マイロとライ麦は少ない。脂質は小麦粉 I と大麦仕上糠 II が多く、中白糠は少ない。灰分は脂質と似たような傾向を示す。炭水化物は中白糠が最も多く、次いで小麦粉 II と大麦仕上糠 I、その他の物はやや少ない。

一般的に穀物は穀粒の外側に近い程タンパク質、脂質および灰分含量が高く、炭水化物が少ない傾向にある。2種類の大麦仕上糠を比較してみると、IIの方がタンパク質、脂質、灰分が多く、炭水化物が少ない。大麦仕上糠 II は I よりも穀粒の外側の部分が多く、I より品質が低い物ではないかと思われる。

1-2. 試験飼料

上記7種類の炭水化物源を配合した試験飼料を調製し、ニジマス稚魚の飼育成績を比較することによって各原料の炭水化物源としての効果を判断した。

表2に試験飼料の組成と分析値を示す。い

ずれの飼料も魚粉 66%、炭水化物源 30%、ビタミン・ミネラル混合 4%の単純な配合にした。各飼料間で炭水化物量に違いが有るが、タンパク質、脂質、灰分に大きな差は無かった。また、カロリー量や CP 比にも区間差は認められなかった。カロリー量はタンパク質 4、脂質 9、炭水化物 2Cal/g の数値を用いて求め、CP 比はカロリー量をタンパク質含量で除して求めた。試験飼料はハードペレットクランブルで、以下の手順で製造した。原料を混合、粉碎し、小型ペレットマシンでハードペレットに成型する。棚式乾燥機で乾燥し、クランブラー（2本のローラーの間に飼料を通して破碎する。粒の大きさは2本のローラー間の距離で調整する。）を通して破碎する。篩を用いて魚の大きさに合った飼料のみを集めて試験飼料とする。

1-3. 飼育試験

平均体重 0.5g のニジマス稚魚を水容量 38.4L の塩ビ製小型水路型水槽³⁾に各区 100 尾収容し、水温 14°C で飼育した。給餌は日に 3 回（午前 1 回、正午 1 回、午後 1 回）、給餌率は改変ライトリッツ給餌率で、飼育期間は 11 月 30 日から 1 月 9 日の 40 日間である。

2. 結果

飼育試験の結果を表3に示す。生残率に区間差は認められなかった。増重量（魚の成長）、飼料効率（増重量×100/給餌量）、タンパク質効率（増重量×100/給与タンパク質量）から、炭水化物源としての効果は中白糠 > 小麦粉 II ≧ 小麦粉 I > 大麦仕上糠 I = マイロ > ライ麦 > 大麦仕上糠 II の順に優れていると判断した。同じ大麦仕上糠であるのに I と II で何故これだけ結果が違うのであろう。IIの方が穀粒の外側の部分が多い低品質品と思われることと関係しているのか、あるいは全く別の要因が有るのであろうか。いずれにせよ魚による消化吸収率を調

表3 飼育試験の結果

試験区	A	B	C	D
生残率 (%)	99.0	99.0	99.5	97.0
増重量 (g)	310.1	310.5	330.3	302.8
給餌量 (g)	232	232	232	232
飼料効率 (%)	133.7	133.8	142.8	130.5
タンパク質効率 (%)	228.9	233.3	247.2	231.1

試験区	E	F	G
生残率 (%)	99.0	97.5	99.0
増重量 (g)	260.4	305.5	285.6
給餌量 (g)	232	232	232
飼料効率 (%)	112.2	131.7	123.1
タンパク質効率 (%)	196.2	223.8	216.5

べて原因を明らかにする必要がある。

飼育試験の結果から、今後の検討如何によって養魚用飼料の炭水化物源として利用出来る可能性が有るのは大麦仕上糠Ⅰとマイロではないかと思われた。

3. 要約

・ニジマス稚魚の飼育成績から、養魚飼料用炭水化物源としての効果は中白糠 > 小麦粉Ⅱ ≧ 小麦粉Ⅰ > 大麦仕上糠Ⅰ = マイロ > ライ麦 > 大麦仕上糠Ⅱの順に優れていると判断した。

・今後の検討如何によって小麦粉や中白糠の代替品になり得る可能性が有るのは大麦仕上糠Ⅰとマイロではないかと考えた。

試験 -2. 消化吸収率の比較

試験 -1 で用いた炭水化物源によって飼育成績に可也の違いが出た。飼料のカロリー量や CP 比と飼料効率、タンパク質効率との関係を調べても明確な相関は認められず、飼料成分の魚による消化吸収率が影響しているのではないかと思われた。よって、試験 -2 では各炭水化物源を配合した飼料を用いてニジマス稚魚によるタンパク質と炭水化物の消化吸収率を比較した。

1. 材料と方法

1-1. 試験飼料

試験 -1 と同じ 7 種類の炭水化物源を用い

た。試験飼料は魚粉 66%、炭水化物源 30%、ビタミン・ミネラル混合 4%、酸化クロム 外割 0.1% の組成とした。飼料はハードペレットクランブルで、製造法は前述通りである。

1-2. 採糞と分析

60L 容角型透明プラスチック水槽の外側を魚を落ち着かせるために黒色ビニールで覆った水槽に平均体重 2.4g のニジマス幼魚を 30 尾ずつ収容し、水温 14.1~15.5°C で飼育した。4 日間試験飼料で予備飼育し、5 日目から排泄された糞をサイホンで回収した。給餌後、水槽底の残餌や夜間に排泄されていた古い糞をサイホンで除去し、消化吸収率測定用の糞と混じらないように注意した。採糞は 10 日間続けて行い、10 日分の糞をまとめて分析サンプルとした。

飼料と糞中のクロム量は古川ら⁴⁾の湿式定量法、タンパク質はセミマイクロケルダール法、炭水化物は塩酸分解法²⁾で測定した。これらの値からタンパク質と炭水化物の見かけの消化吸収率⁵⁾を求めた。

2. 結果

タンパク質と炭水化物の消化吸収率、飼料のタンパク質含量と炭水化物含量に消化吸収率を乗じて求めた飼料 100g 当りから魚に吸収されたタンパク質と炭水化物の量を表 4 に纏めて示す。

タンパク質の消化吸収率に区間差は認められなかった。一方、炭水化物は原料による違いが大きく、中白糠の消化吸収率が最も高く、次いで大麦仕上糠で、小麦粉、マイロ、ライ麦は低い値を示した。吸収量も消化吸収率と略同じ傾向を示し、タンパク質は 53-56g/100g 飼料で、殆ど区間差は無かった。炭水化物も消化吸収率と略同じ傾向であったが、マイロは著しく少ない値を示した。

タンパク質と炭水化物の消化吸収率、タンパク質と炭水化物の吸収量、吸収量を基にして求めたカロリー量と CP 比などと試験 -1 の飼育

表4 飼料タンパク質と炭水化物の消化吸収率と吸収量

	飼料 (%)		消化吸収率 (%)		吸収量 (g/100g 飼料)	
	タンパク質	炭水化物	タンパク質	炭水化物	タンパク質	炭水化物
A	58.4	17.8	94.7	64.8	55.3	11.5
B	57.4	22.4	95.2	57.7	54.6	12.9
C	57.6	23.4	95.0	79.6	54.7	18.6
D	56.5	21.3	94.5	71.6	53.3	15.2
E	57.2	23.5	94.8	75.6	54.2	17.8
F	58.9	16.5	95.4	54.6	56.1	9.0
G	56.9	21.9	94.2	58.4	53.6	12.8

成績（飼料効率，タンパク質効率）との関係を調べてみたが，何れにも強い相関は認められなかった。

これまでの試験で飼料の CP 比や炭水化物の吸収量と飼育成績の間には強い正の相関が存在することが示されているのに，何故このような結果になったのであろう。飼育成績に大きな影響を及ぼす未解明の要因が有るのかも知れない。

3. 要約

- 飼料タンパク質の消化吸収率に炭水化物源の違いによる影響は認められなかったが，炭水化物の消化吸収率は原料の違いによる差が大きかった。中白糠の消化吸収率が最も高く，次いで大麦仕上糠で，小麦粉，マイロ，ライ麦は低かった。

- 飼料炭水化物の吸収量は消化吸収率と略同様の傾向を示したが，マイロの吸収量は他より著しく低かった。

- 飼料の炭水化物含量，消化吸収率，吸収量以外にも魚の飼育成績に影響を及ぼす要因が有るのではないと思われる。

試験-3. オートクレーブ処理の効果

既にニジマスとアユの試験⁶⁾で，β 澱粉よりα 澱粉の方が人工消化率と消化吸収率が高く飼育成績も優れていることと，β 澱粉であってもエクストルーダー処理を行うとα 澱粉と同等の効果を持つようになることを明らかにした。よって，本試験では単離した澱粉ではなく原料その物でもα化処理（加湿+加熱）を行

えば炭水化物の利用率が改善されるか否かをジアスターゼによる人工消化率と魚による消化吸収率の変化で調べた。

1. 材料と方法

1-1. 人工消化率

炭水化物源には小麦粉 I，大麦仕上糠 I，II，マイロ，ライ麦の 5 種類を用いた。これらの原料にオートクレーブ処理（1.2 気圧，121°C，20 分間）を行い，人工消化率の変化を調べた。総炭水化物量は塩酸分解法，人工消化率はジアスターゼ処理による方法で求めた²⁾。

1-2. 消化吸収率

炭水化物源が上記 5 種類である以外，試験飼料の組成や製造法などは試験-2 と同じである。平均体重 4.9g のニジマス幼魚を各区 20 尾前述の水槽に収容し，水温 15~17 度で飼育した。魚を収容後一週間市販飼料で予備飼育して飼育環境に馴致させた。その後 3 日間試験飼料を与え，4 日目から 10 日間連続して採糞した。10 日分の糞を合わせて分析サンプルとした。採糞法や採糞時の注意点，分析法などは試験-2 と同じである。

2. 結果

2-1. 人工消化率

オートクレーブ処理前後の人工消化率を比較すると表 5 に示す様に大麦仕上糠 I のみが著しく高くなっていた。小麦粉 I，大麦仕上糠 II，マイロ，ライ麦などは殆ど変化がなかった。大麦仕上糠 I 以外の原料では，今回のオートクレーブ処理程度では澱粉のα化には不十

表5 オートクレーブ処理による人工消化率の変化

	処理前 (%)	処理後 (%)	後 / 前
小麦粉 I	70.9	74.3	1.05
大麦仕上糠 I	69.3	88.6	1.28
大麦仕上糠 II	81.9	79.6	0.97
マイロ	43.2	46.7	1.08
ライ麦	60.7	62.0	1.02

表6 試験飼料の消化吸収率

炭水化物源	全体	タンパク質	炭水化物
小麦粉 I	85.5	94.1	81.0
大麦仕上糠 I	85.9	93.6	82.1
大麦仕上糠 II	85.9	94.9	79.8
マイロ	82.2	93.7	85.6
ライ麦	83.6	93.4	81.6

分であったか、あるいは前報²⁾で説明した原料の粒径他の要因によって人工消化率が変化しなかったのかも知れない。

2-2. 消化吸収率

オートクレーブ処理した炭水化物を配合した飼料の消化吸収率を表6に示す。未処理の炭水化物源を用いて調べた結果を示した表4と比較すると、タンパク質の消化吸収率はオートクレーブ処理によっても変化していなかった。これはタンパク質源である魚粉は処理していないので当然であろう。炭水化物の消化吸収率は全ての炭水化物源でオートクレーブ処理によって上昇しており（小麦粉 I 1.25 倍、大麦仕上糠 I 1.15 倍、大麦仕上糠 II 1.06 倍、マイロ 1.57 倍、ライ麦 1.40 倍）、特に未処理時に消化吸収率が低かったマイロ、ライ麦、小麦粉の上昇率が高かった。また、オートクレーブ処理原料の炭水化物消化吸収率は未処理原料の様な大きな違いは無くなり、何れも 80~86% で略等しい値を示した。この結果は人工消化率の変化とは明らかに異なっており、やはりそれぞれの原料の効果を明らかにするためには魚を使って消化吸収率を測定したり、飼育試験を行ったりしなければならないことが確認出来た。飼料全体の消化吸収率はマイロとライ麦で他区よりやや低い値を示した。

以上の結果から、供試原料の炭水化物源としての効果がオートクレーブ処理によって向上する可能性が示された。但し、本試験の採糞時の水温が 15~17°C と、未処理原料の採糞時の水温 14~16°C より約 1°C 高かったため、水温の違いによる影響の可能性も否定出来ない。よって、オートクレーブ処理した炭水化物源を用いれば飼育成績も改善されるか否かも調べる必要が有る。

3. 要約

- ・オートクレーブ処理によって大麦仕上糠 I のみ人工消化率が著しく向上した。
- ・飼料タンパク質の消化吸収率は炭水化物源のオートクレーブ処理によって影響を受けなかった。
- ・炭水化物の消化吸収率はオートクレーブ処理によって向上し、特に未処理時に消化吸収率が低かった物ほど向上率が高かった。
- ・オートクレーブ処理した原料では、炭水化物消化吸収率の原料による違いは小さかった。

試験 -4. オートクレーブ処理炭水化物源を用いた飼料による飼育試験

試験 -3 で炭水化物源をオートクレーブ処理すると魚による炭水化物の消化吸収率が改善されるので、飼育成績も改善される可能性が有ることを示した。よって本試験では、オートクレーブ処理した 3 種類の炭水化物源を用いてニジマス稚魚の飼育試験を行い、飼育成績が改善されるか否かを調べた。

1. 材料と方法

1-1. 試験飼料

前述した条件でオートクレーブ処理した小麦粉 I、大麦仕上糠 I およびライ麦を炭水化物源に用いた。表7に試験飼料の組成と分析値を示す。オートクレーブ処理物には原料名の前に AC を付記してある。また、表3に示す未処理の炭水化物源を用いた場合の飼育試験と比較するため、未処理の中白糠（試験 -1 に用いた中白糠と同じ物）を炭水化物源とした区も対照として設定した。

表7 試験飼料の組成と分析値

試験区	A	B	C	D
魚粉 (%)	66	66	66	66
中白糠	30			
AC小麦粉		30		
AC大麦仕上糠 I			30	
ACライ麦				30
ビタミン・ミネラル混合	4	4	4	4
水分 (%)	4.1	4.2	4.1	3.7
タンパク質	58.0	59.1	57.7	57.4
脂質	4.5	5.9	5.2	4.6
灰分	8.2	7.6	9.2	8.1
炭水化物	24.5	19.9	23.7	23.1
Cal/100g	322	329	325	317
C/P 比	5.54	5.57	5.63	5.53

飼料成分に各区間で大きな違いは無かった。カロリー量、CP比も同様であった。試験飼料はハードペレットクランブルで、製造法は前述の通りである。

1-2. 飼育試験

平均体重 0.4g のニジマス稚魚を各区 200 尾収容し、3 月 8 日から 4 月 17 日の 40 日間飼育した。飼育試験の条件は試験 -1 と同じである。

2. 結果

飼育結果を表 8 に示す。魚の成長、飼料効率、タンパク質効率などの飼育成績は未処理の炭水化物源を用いた試験 -1 の結果と傾向は同じであるものの、区間差は小さくなっていった。特にオートクレーブ処理した大麦仕上糠 I は未処理の中白糠と同等の飼育成績を示したので、オートクレーブ処理大麦仕上糠 I は中白糠の代替品として利用出来る可能性が高い。

試験 -1 と本試験の中白糠区の結果を比較して他区の結果を補正し、オートクレーブ処理前後で飼料効率が如何変化したかを調べると、小

表 8 飼育試験の結果

試験区	A	B	C	D
生残率 (%)	100	100	100	100
増重量 (g)	307	291	307	285
給餌量 (g)	220	220	220	220
飼料効率 (%)	139.6	132.3	139.6	129.6
タンパク質効率 (%)	240.7	223.8	241.8	225.7

麦粉 I では 1.01 倍と殆ど改善は認められず、大麦仕上糠 I は 1.09 倍、ライ麦は 1.07 倍であった。オートクレーブ処理による炭水化物の消化吸収率の変化は小麦粉 I で 1.25 倍、大麦仕上糠 I で 1.15 倍、ライ麦で 1.40 倍であったのに、飼育成績にはこの値が直接反映されていなかった。

以上の結果から、炭水化物源のオートクレーブ処理によって魚による炭水化物の消化吸収率は改善されるものの、それが直接飼育成績に反映されるとは限らないことが分かった。また、

原料によって飼育成績の改善程度に違いがあり、殆ど改善が見られない小麦粉 I から約 10% 改善される大麦仕上糠 I まで存在した。オートクレーブ処理によって効果が改善される物とされない物が有ることから、今後加熱処理 (α 化処理) された原料毎に効果を調べる必要が有る。

3. 要約

- ・炭水化物のオートクレーブ処理の有無によって飼育結果の傾向は変わらないものの、オートクレーブ処理によって区間差は小さくなった。
- ・オートクレーブ処理による炭水化物消化吸収率の変化は直接飼育成績の改善に結びつかない場合も有る。
- ・オートクレーブ処理による飼育成績の改善は炭水化物源によって異なり、殆ど認められない物から 10% 程度改善される物まで有る。
- ・オートクレーブ処理大麦仕上糠 I は未処理の中白糠と同等の飼育成績を示したので、オートクレーブ処理大麦仕上糠 I による小麦粉や中白糠の代替が可能であると考えられる。

考察

これまでの試験で中白糠は小麦粉より養魚飼料の炭水化物源として優れていることが分かっているが、中白糠は供給可能量や価格に

多少難が有る。よって、安価である程度の供給量が有る物で、中白糠の代替品となり得る物をニジマス稚魚の飼育試験によってスクリーニングした。その結果、原料そのままでは中白糠と同等かそれ以上の効果を有する炭水化物源は今回検討した物には無かったが、何らかの処理をすることによって可能性が生じるのではないかと思える物に大麦仕上糠Ⅰとマイロがあった。ニジマス稚魚で炭水化物の消化吸収率を測定してみると、マイロは著しく低いことが分かり、最も可能性が高い原料として大麦仕上糠Ⅰが残った。

澱粉の試験で、β澱粉よりα澱粉の方が人工消化率、消化吸収率、飼育成績共に優れていることや、β澱粉でもエクストルーダー処理を行うことによってα澱粉と同等の効果を持つようになることが分かっている。そこで炭水化物源のオートクレーブ処理前後において人工消化率を比較したところ、大麦仕上糠Ⅰのみ値が著しく高くなっていた。次いで消化吸収率を測定したところ、全体的にオートクレーブ処理によって炭水化物の消化吸収率は向上したものの、原料による違いが大きく、未処理時に消化吸収率が低い物ほど改善率が高かった。炭水化物の消化吸収率の違いはオートクレーブ処理によって小さくなることが分かった。

オートクレーブ処理炭水化物源を配合した飼料でニジマス稚魚を飼育したところ、大麦仕上糠Ⅰは未処理の中白糠と同等の飼育成績を示したので、オートクレーブ処理大麦仕上糠Ⅰによる中白糠の代替が可能であると判断した。また、オートクレーブ処理による飼育成績の改善は炭水化物源によって異なり、殆ど改善されない物から10%程度改善される物まであったので、原料毎の検討が必要である。

以上の様に、炭水化物がα化した原料を用いると概ね飼育成績が改善されるので、今後はα化原料をスクリーニングする必要が有る。一般的に、エクストルーダー処理された飼料原料や食品廃棄物・バイプロなどは炭水化物量

が高く、加熱処理されていて澱粉がα化している物が多いので、検討する価値が高いと考える。以前報告した菓子粉⁷⁾等はその良い例であろう。

製造コストは高くなるものの、飼料をエクストルーダー飼料とするのも有効な方法である。エクストルーダー処理することによって、現在未利用の安価な炭水化物源が利用出来るようになる可能性が高い。

追加資料

これまで養魚飼料用炭水化物源の消化吸収試験や飼育試験は、試験が簡単であることからニジマス稚魚で実施してきた。ニジマスは炭水化物の利用能が低いことが知られており、コイなどの炭水化物利用能が高い魚でニジマスと同様の結果が出るか否か分からなかった。今回、炭水化物の利用能が高い魚種の一つであるアユを用いて4種類の炭水化物源を配合した飼料の消化吸収率を測定出来たので、追加資料として付記しておく。

1. 材料と方法

1-1. 供試炭水化物源

炭水化物源には小麦粉Ⅰ、Ⅱ、米粉および中白糠を用いた。表9に分析値を示す。それぞれの成分組成の特徴は既に述べた通りである。人工消化率はジアスターゼ処理による炭水化物の人工消化率で、測定法は従来通りである。小麦粉と米では米の方が人工消化率が高く、小麦粉では炭水化物含量が高い高品質品の方が人工消化率が低い。米粉(うるち米粉砕物)と中白糠(酒

表9 供試炭水化物源の分析値

	小麦粉Ⅰ	小麦粉Ⅱ	米粉	中白糠
水分 (%)	12.3	13.3	13.9	13.1
タンパク質	18.7	15.2	8.6	15.3
脂質	5.5	1.4	3.1	6.3
灰分	3.8	0.7	1.8	3.5
炭水化物	49.5	61.6	56.1	60.5
人工消化率 (%) *	74.3	61.3	75.7	99.2

*: ジアスターゼによる炭水化物の人工消化率

表 10 試験飼料の組成と分析値

試験区	A	B	C	D
魚粉 (%)	73	73	73	73
小麦粉 I	21			
小麦粉 II		21		
米粉			21	
中白糖				21
飼料酵母	2	2	2	2
ビタミン・ミネラル混合	4	4	4	4
酸化クロム (外割 %)	0.1	0.1	0.1	0.1
水分 (%)	4.3	4.5	4.0	5.8
タンパク質	55.3	56.1	56.3	54.7
脂質	6.5	6.6	5.8	5.9
灰分	15.2	14.5	14.3	14.0
炭水化物	12.9	15.2	15.4	18.4

造好適米由来)では中白糖の方が高く、小麦粉 I と米粉は略等しい人工消化率を示した。これらの結果は従来の試験結果と同じである。

1-2. 試験飼料

消化吸収率測定用飼料の組成と分析値を表 10 に示す。飼料はハードペレットクランブルで、製造法は前述の通りである。炭水化物は塩酸分解法²⁾、クロムは湿式定量法⁴⁾で測定した。

1-3. 採糞法

1KL 容円形コンクリート水槽 2 面に収容したアユを市販飼料で一週間予備飼育して環境に馴致した。その後試験飼料に切り替え、4 日目から 3 日間連続して採糞した。採糞法は排泄された糞を回収する方法、腸管切開法、腹部圧迫法などを検討した結果、時間はかかるが腹部圧迫法が最も良い結果を得たので、腹部圧迫法を採用した。給餌は 9 時とし、採糞は 13 時に行った。この時間に採糞したのは、予備試験で給餌後魚を経時的に解剖して消化管内容物の移行状

態を調べたところ、13 時には腸の後半部に内容物が移行していることを確認したことによる。

採糞はアユを軽く麻酔し、体表の水をペーパータオルで拭き取り、腹部を指で軽く圧迫して行った。糞は 3 日分を合わせて分析サンプルとした。

水槽が 2 面しかなく、一回の試験で 2 飼料しか採糞出来ないの、ローテーションを組んで各飼料共 2 回ずつ採糞を行った。採糞条件の詳細は表 11 に示す。一つの試験飼料の採糞が終了した後数日間市販飼料を与え、次いで別の試験飼料

を 3 日間与え、4 日目から 3 日間連続して採糞した。

2. 結果

2-1. 糞の状態

採糞時に糞の状態を肉眼で観察した結果を表 12 に示す。原料、水温、魚の大きさによって糞の状態が変化すること、糞の量によってある程度消化吸収率が推定出来ることが分かる。

2-2. 消化吸収率

飼料タンパク質と炭水化物の消化吸収率を原料毎に纏めて表 13 に示す。各原料の最下段には 2 回の試験の平均値を示す。

アユによる炭水化物の消化吸収率は原料によって可也異なり、中白糖 > 米粉 > 小麦粉 II > 小麦粉 I の順に高かった。小麦粉より米関連物の方が消化吸収率が高いのは、ニジマスの場合と全く同じ結果であった。ニジマスでは小麦粉 I と II の間にそれ程大きな違いは認められな

表 11 採糞条件

実施回次	採糞日	水槽	炭水化物源	水温 (°C)	魚体重 (g)
I	4 月 23 日 ～ 25 日	1	小麦粉 I	15.1 ～	5 ～ 10
		2	中白糖	17.0	
II	5 月 7 日 ～ 9 日	1	小麦粉 II	21.0 ～	約 10
		2	米粉	22.5	
III	5 月 16 日 ～ 19 日	1	小麦粉 II	16.8 ～	約 10
		2	中白糖	18.0	
IV	5 月 28 日 ～ 30 日	1	米粉	18.4 ～	10 ～ 15
		2	小麦粉 I	19.7	

表 12 糞の状態

実施回次	糞の状態
I	中白糖より小麦粉 I の糞の方が粗く、下痢便個体が多い。 採糞量も小麦粉 I の方が多い。
II	小麦粉 II と米粉では糞の状態に違いは無い。下痢便個体も少ない。 採糞量は米粉の方がやや多い。
III	小麦粉 II, 中白糖共に糞の状態は良い。 採糞量は小麦粉 II の方がやや多い。
IV	小麦粉 I の糞は正常であるが、米粉は粘液状の糞が多い。

表 13 飼料タンパク質と炭水化物の消化吸収率

炭水化物源	試験回次	消化吸収率 (%)	
		タンパク質	炭水化物
小麦粉 I	I	86.6	52.8
	IV	91.3	68.1
	平均	89.0	60.5
小麦粉 II	II	91.6	69.6
	III	90.8	71.0
	平均	91.2	70.3
米粉	II	91.4	80.7
	IV	91.0	78.7
	平均	91.2	79.7
中白糖	I	91.1	84.7
	III	89.9	88.2
	平均	90.5	86.5

かったが、アユでは低水温で魚が小さい場合に小麦粉 I を用いると下痢状便を呈し、消化吸収率が著しく低く、タンパク質の消化吸収率にも影響を及ぼしている様である。タンパク質の消化吸収率はこの場合を除き、原料による大きな

違いは無かった。

アユの場合、低水温時の小型魚には“フスマ”に近い低品質の小麦粉は使用しない方が良い様である。また、高品質の小麦粉であっても米関連物に比べると消化吸収率が低いので、可能であれば小麦粉より米関連物を炭水化物源として用いる方が良いと考える。また、糞の状態と消化吸収率の間には強い相関が有るように思えるので、糞の状態でアユ用飼料の炭水化物源としての適性がある程度判断出来る可能性が有る。アユの養殖業者は糞の状態を非常に気にする人が多いのは、この様なことを経験的に知っているであろう。

以上の結果から、低水温で小型魚を用いる場合以外は、ニジマスの結果をアユに適用することが出来るのではないかと推測する。アユの好適水温は冷水性魚であるニジマスより遥かに高いことと関係しているであろう。

文 献

1. 酒本秀一：ニジマス用飼料の炭水化物源 -1, *New Food Industry*, **60**(10): 46-56. 2018.
2. 酒本秀一：ニジマス用飼料の炭水化物源 -2, *New Food Industry*, **60**(11): 30-41. 2018.
3. 酒本秀一, 糟谷健二：魚類の細菌性感染症に対するブドウ種子抽出物と β -1,3/1,6- グルカンの予防効果, *New Food Industry*, **53**(7): 26-40. 2011.
4. 古川厚, 塚原宏子：養魚飼料消化試験の指標物質としての酸化クロムの湿式定量法について, *日本水産学会誌*, **32**(6): 502-506. 1960.
5. 吉中禮二：タンパク質・魚・貝・海藻の栄養機能 - 日本型食事のすすめ - (吉中禮二著), 恒星社厚生閣, 東京, 53-68. 1993.
6. 酒本秀一：ニジマス用飼料, アユ用飼料の適切な α 化澱粉添加量, *New Food Industry*, **60**(9): 65-80. 2018.
7. 酒本秀一：養魚飼料原料としての食品廃棄物やバイプロ -1. 菓子粉, 出汁粕, パン屑, *New Food Industry*, **55**(2): 49-57. 2013.

連絡先：酒本 秀一 email: si290347-5313@tbz.t-com.ne.jp

グルテンフリー穀物 食品と飲料, グルテンの検知- 3

瀬口 正晴 (SEGUCHI Masaharu)^{1,2}

竹内 美貴 (TAKEUCHI Miki)³ 中村 智英子 (NAKAMURA Chieko)³

¹ 神戸女子大学, ² 日本穀物科学研究会会長, ³ 神戸女子短期大学

Key Words : グルテンフリー セリアック病

本論文「グルテンフリー穀物 食品と飲料, グルテンの検知-3」は, “Gluten-Free Cereal Foods and Beverages” (Edited by E. K.Arendt and F.D.Bello) 2008 by Academic Press (ELSEVIER), の第3章 Detection of gluten by Herbert Wieser の一部を翻訳し紹介するものである。

市販の ELISA キット

通常, 利用できるアッセイは, Codex のレギュレーションにとって重要な必須条件であるが, 僅か2-3の進んだELISAテスト法のみが市販の試験キットになっている。サンドイッチELISAはPAbを用いたものがRiedel-de Haen AG (Seelze, 独; article no.45213) 社から販売されている。抗血清はいろいろな小麦品種から天然のグリアジンと同一品種のグリアジンを加熱変性し, その混合物がウサギの免疫によってつくられた (Weisgerber, 1998)。マイクロタイター板 (ポリスチロール) はPAbでコートされている。検知抗体はホースラデッシュペルオキシダーゼでラベルされており, 基質溶液には tetramethylbenzidine/peroxide を含んでいる。グリアジンスタンダードは, 独小麦13品種のミックスを70%エタノール抽出した物を用いた。マトリックス効果を押さえるために, サンプル抽出物は分析前に1:5000に薄める。検知限界は, 100mg グルテン/kg 食品で, 結果的にはグルテンフリー食品の制御 (コントロール) にはあまりに高すぎる。サンプルは1時間で調製し, 2.5時間内に実験を行なう。

サンドイッチELISAはSkerritt and Hill (1990) によって進歩し, いくつかの会社で商品化され, たとえばCortecs社 (UK), Transia社 (France), R-Biopharm社 (独) である。 ω -グリアジンに対し2種のMAbをウェル壁に付着し, 他の抗体はホースラデッシュペルオキシダーゼを結合し, 基質percarbamideが検知に用いられる。発光体は2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazole-6-sulfonic acid) (cortecs) あるいは tetramethyl benzidine (Transai, R-Biopharm) である。グリアジンスタンダードは小麦粉品種Timgalenの40%エタノール抽出液によってつくられた。サンプルは40%エタノールで抽出され, 1:100に希釈することで進められた。検知限界は約10ng グリアジン/mLであり, 感度は会社から20-100mg/kgと示された。アッセイはリングテストでうまく行き (Skerritt and Hill, 1991a), Association of Official Analytical Chemists (AOAC) で確認された。サンプル数の分析 (ソバ, 米粉, コーン, 小麦デンプン) は, グリアジンを入れこんだものであるが, しかしながら, 同じ ω -グリアジンに対するMAbをベースにした異なった市販のELISAキットとはその結

果に大きな違いがあった (Sima ら 1999)。そこで著者が結論にしたのは、キットでは信頼を持って未知サンプル中のグリアジン含量を決めることは不可能であると。

グルテンフリー食事のコンプライアンスを改良するために、家庭用に簡単なプロトタイプの基本試験キットを作った (Skeritt and Hill, 1991b)。食品からは希釈塩酸で抽出し、その抽出液の1ドロップを抗体でコートしたチューブに入れ、酵素ラベルした抗体を加え、3分後、チューブは洗われ発色剤を加える。反応は2分後、硫酸の添加で止まる。家庭用キットは、定量的な実験室用キットと比較すると、定性的一致は非常にある。キットは食品を区別し、グルテンのわずか入った食品 (グルテンフリー食品として認められる) と、もう少し多くグルテンの入ったもの、しかしグルテン含量は受け入れられないもの、とを区別出来た。 ω -グリアジンに対する MAb の重大な欠点は、このタンパク質タイプの比率は小麦、ライ麦、大麦の貯蔵タンパク質によると比較的 low、強く品種に偏ることである。例えばグリアジンの小麦 16 品種のタイプの重量値は全グリアジンの 6.2-20.0% の範囲を示し、そこでその方法はかなりのシステムのエラーのもとになる (Wieser, *et al.*, 1994)。これはいろいろな小麦品種 (ふつうのもの、durum 小麦, spelt, emmer, einkorn) からのグリアジン区分に基づく研究によってはっきりした (Seilmeier and Wieser, 2003)。計算カーブはグリアジン区分の同一のタンパク質レベルにもとづいたもので、参照キットグリアジンとは大きくちがっており、そのため区分のグリアジン含量は一部、強く下回ったり、あるいは上回ったりする。

サンドイッチ ELISA で R5MAb にもとづくもの (Valdes ら 2003) が R-Biopharm 社 (独), Ingenasa 社 (Spain) から出された。R-Biopharm 社は 4 つの異なったキットをだし (Immer と Lauterbach, 2003), 小麦, ライ麦, 大麦からのプロラミンの検出をした。全てのシステムは、参照グリアジンに適合 (応) され、それ

は van Eckert *et al.*, 2006 にのべられ、2つの抽出方法が提案された (1 g サンプル / 10mL); (i) 60% エタノールで正常に抽出, (ii) とくに加熱変性サンプルに対していわゆるカクテル (本誌 2018 Vol.60 No.11 p43 図 3.1) で抽出された。Ridascreen[®] Test Gliadin (R7001) は 3 × 300 分インキュベーション時間をすすめ、6個の参照タンパク質濃度、5ng/mL でスタートするものを供給した。検出限界は、両方のキットで 5-10mg グルテン / mL とわかった。3 番目のテスト、Ride[®] Quick Gliadin (R7003) は側方流動技術をベースにし、stick をふくむキットによるもので、そこに MAb が固定されている (Garcia *et al.*, 2002)。その stick は希釈サンプル抽出中に入れられ、もしサンプルに適量なプロラミンが入っていれば 5 分後、赤いラインが見える。アッセイは約 10mg グリアジン / kg の感度である。このアッセイはとくに適しているのは綿棒法で、プロラミンのコンタミ用の機械あるいはテーブルのような環境用のもののチェックに対して適している。Stick キット (stick グルテン) は Operon, S.A. (Guarte de Huerva, Zaragoza, Spain) でも売っている。最近、4 番目のテストが R-Biopharm, Ridascreen[®] Gliadin Competitive (R7011) から紹介された。

このアッセイはプロラミンからくる小ペプチドの検知ができ、とくにプロラミンの部分加水分解されたものですすみ、例えばそれは大麦抽出物、ビール (本誌 2018 Vol.60 No.11) のような物である。Ingenasa 社は 200 の ELISA システムを商品化し、それは R-Biopharm R7001 と R7002 に相当するものであり、Ingezim Gluten (Ranz, *et al.*, 2004), Ingezim SEMIQ (Rang *et al.* 2005) である。2つのキット (Ridascreen Gliadin と Ingerasa Ingezim Glute,) はリングテストに入る (Mendez *et al.*, 2005)。20 の研究所は 12 のコードしたサンプル (グリアジンを添加したあるいはグリアジンのコンタミ) のグリアジン含量の評価の為のコードしたフォームで参加し、各抽出物 3 段階に希釈したものを using 2 回の実験を行なった。両キットで得

られたデータの統計処理は 11-25% の繰り返し性があり, 23-47% の再現性だった。はっきりとグリアジンのなしと含まれたサンプルの間の区別ができた。両キットはグリアジンコンタミの測定が有効であり, そして 3.0mg gluten/kg の感度で保証した。2005 年 R5ELISA は The Codex Committee of Method of Analysis and Sampling (CCMAS) によってタイプ I 法として指示され, そして最近の Draft Revised Codex Standard CL 2006/5-NFSDU (2006) によって推薦された。

電子化学センサー (Electrochemical sensors)

最近, Institut für Mikrotechnik Mainz (IMM) が, これは EU プロジェクト CD-CHEF によって設定されたのだが, 食品のグルテン含量 (www.Imm-mainz.de) の測定にチップシステムを発表した。検知のために ELISA のいろいろなフォーマットと酵素リンクさせたオリゴヌクレオチッドアッセイ (ELONA) が生まれ, それでグルテンタンパク質の認知が可能だった。全てのセンサーは平常のものでレセプター分子 (抗体あるいはペプチド) は基質表面に固定する。抗原の結合後, 酵素反応が引き金であり, その結果蛍光あるいは電子化学信号が出る。オペレシエル検知のためにチップがデザインされ, そこでは多くの beam-guiding 成分がまとめられる。2つのエレクトロード (電極) (ワーキング電極として金板, レフェレンス, カウンター電極として Ag/AgCl 層) が, チップ中に電流測定用センサーとしてある。さらに, これらのチップシステムの有用性のために改良研究されねばならない。

ポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase chain reaction)

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) は, 特異的 DNA の決定に基づいている。タンパク質分析と比べ, DNA 分析は感度の点で数オーダーさらに上である。ある DNA 配列の 2-3 分子は 10^6 - 10^8 のファクターで短時間のうちに増強で

きる。PCR は加熱したものにまた応用されたがそれは DNA はタンパク質よりかなり加熱安定であるためだ。最初の PCR のステップは DNA 抽出と加熱であり, それは変性と単一の系に分離をすることが出来る。つづいて, プライマー (ターゲット DNA のあるポジションに対する相応する基本配列をもつオリゴデオキシヌクレオチド) は加えられ, 1本の糸の相応するセグメントとハイブリダイズする。4個のデオキシヌクレオチド 5'-トリフォスフェートとサーモステーブル DNA ポリメラーゼを添加して新しいコンプリメンタリースtrand (糸) が合成される。DNA は 20-30 回のステップの繰り返しで増幅され, 電気泳動的に分析される (定量 PCR)。定量 PCR にとってまた "real-time PCR" と呼ばれるが, オリゴデオキシヌクレオチドで蛍光あるいは酵素マーカーでラベルされたものは用いられて, そして定量は蛍光あるいは色の強さで測定される。計算はスタンダード DNA フラグメントで行なわれた。両定性, 定量 PCR は自動的に DNA-Thermal Cycle の測定によって行なわれた。

Switzerland, ベルンの Luthyl のグループは, 初めてグルテン分析に対して PCR を用いた。Allmann, *et al.*, (1993) は高度に保護された真核生物 DNA 配列に対する特異的なプライマーを用いたが, それは PCR 増幅に供して可能であるものである。分離して核酸基質を与えるものである。このアッセイは 35 種異なった食品サンプルをテストし, 大麦添加から加熱加工食品のサンプルまでがある。小麦デンプンは非常に低いグリアジン含量であるが, 強くポジティブに反応し, さらに純粋なグリアジンあるいはグルテンで添加物としたものは検知されなかった。PCR と ELISA (Ridascreen® Gluten Kit) は, 小麦を入れたオートサンプルの分析によって比較された (Koppel, *et al.*, 1998)。その結果は次の事を示し, 小麦 PCR システムは ELISA システムより 10 倍感度が高く, 分離された DNA は増幅される事が示された。

定量的コンペテティブ (QC-) PCR システムは,

Dahinden, *et al.*, (2001) によって展開され, 小麦, ライ麦, 大麦のコンタミの検知に用いられた。このシステムは同時に小麦, ライ麦, 大麦 DNA を認知し, それはクロロプラスト trnL ジーンの非コーディング域のベースに基づく物である。内部 DNA スtrandは 20bp 添加で元の PCR 生産物につくられる。QC-PCR システムは 15 商業上利用出来るグルテンフリーとラベルされた食品に応用され, ELISA (Ridascreen® Gluten Kit) と比較した。両方法とも殆どの場合同一の結果を示した。そしてグルテンフリー食品のテストに互いにサポート出来る事が提案された。リアルタイム PCR 利用メルテイグカーブ分析による食品の同定は Sandberg, *et al.*: (2003) によってつくられ, 食品サンプル中とくに小麦, ライ麦, 大麦, オート麦コンタミ区別用に作られた。PCR 法は ELISA と良い相関性があつた (Transia Plate Gluten)。ゲル電気泳動を用いた融解曲線分析の有用性は, 分析が同じ閉鎖したキャピラリーを増強の為に用いており, このためサンプル間のコンタミの危険性は除去された。Henterich, *et al.*, (2003) は, グリアジン検知用 one-step リアルタイム免疫-PCR を導入した。この技術では, R5MAb はオリゴヌクレオチドと結合する; グリアジン分析の感度は ELISA で達するレベルより 30 倍以上増加する。Mujico, *et al.*: (2004, 2005) は, 小麦, ライ麦, 大麦 DNA の測定のため 3 つの異なるリアルタイム PCR システムを進歩させた。3 システムの結合で, 穀物のタイプの区別のみならず, 小麦, ライ麦, 大麦のオート麦サンプルへのコンタミの比率も決めた。この研究で示されたデータは殆どのオートサンプルはコンタミであり, 主には大麦であつた。PCR と R5ELISA の比較で, トウモロコシ粉, 未加熱製品サンプルの分析比較は良い相関性があつた (Mujiro and Mendez, 2006)。サマリーとして, 実質 PUR システムの進歩は, 免疫法 (例えば ELISA と Western blot) に対しグルテン分析捕捉的なものとして感度の高い方法である事がわかつた。ビール, シロップ, モルト抽出のよう

な加水分解された食品からの DNA はしかしながら PCR システムでは, 検知できない。

マスマスペクトロメトリー

最近 matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) がタンパク質の分子マス決定に重要な方法となって来た。この技術は 1000 から 100000 までのマスの同時測定ができ, そこではクロマト的なピュアリフィケーションはできないが, 数分で低ピコモルの範囲で出来る。それは完全なタンパク質のみならず, 加水分解されたタンパク質でも分析できる。MALDI-TOF MS は 3 パーツに分かれている; マトリックスへの分析物の結合, レーザーによる分析物のイオン化と脱着, マスマスペクトロメーターによる分析物の分離と検知である。マトリックス (例えば sinapinic acid) は適当な揮発性溶剤にとりかき, 分解物と混ぜ, 金属板にスポットし, 真空で乾燥する。レーザー光 (殆どパルスを流す窒素レーザーで波長 337nm) は, そのスポットで燃やし, それから, 分析物はイオン化し揮発相になる。多くのレーザースポットは, signal-to-noise 比 (信号対雑音比) を改良するのに用いられる。

マスマスペクトロメーターのタイプは殆ど MALDI と組み合わせて用いられたのが, TOF マスマスペクトロメーターである。イオンはレーザーで離され, 短い高ボルテージのインパルスで強調され, さらにその mass (m) のチャージ (z) に対する比率 (m/z) でわけ, イオン化した分解物を空にしたフィールドフリーのドリフトチューブ中を横断させる時間の測定 (microseconds) を行なう。重いイオンはより高い物よりもゆっくりとなる。分離したイオンはチューブの端に達し適当なレコーダーによって検知され, シグナルは各イオングループにインパクトする。デジタル化したデータは次々レーザーショットから生まれ合計して TOF マスマスペクトラムを生じる。マドリードの Mendez のグループは, 初めて MALDI-

TOFMS を用いてセリアック毒プロラミンの同定に用いた (Mendez *et al.*, 1995)。この技術の高度の回析と感度はグリアジン, セカリン, ホールデン, アベニンのプロトン化した分子マスで用いられ, 解決のための典型的なマスパターンを示した。著者らは, MALDI-TOFMS が食品中のグルテンの同定に有用な新たな技術である事を提案した。サンプル調製は全く簡単であるとわかった (Camefesta, *et al.*, 1997a)。実験はただプロラミンを含むアルコール抽出物を detergent (octyl- β -D-glucopyranoside) と適当なマトリックス (sinapinic acid in acetonitrile (30%) /trifluoroacetic acid (0.1%)) と混合するだけである。この混合物の一部はステンレススチールの探りチップ (probe tip) 先端にのせ, 乾燥し, そして MALDI-TOF マススペクトロメーターで測定する。装置は外部から牛血清アルブミン, 馬心臓サイトクローム C の混合物で外部較正された。検出限界は, グリアジンでは 0.01mg/mL 抽出であった。プロラミン抽出物の還元剤利用は MALDI-TOF MS による分析のハンデキャップにはならない。30 種の食品 (小麦パン, 小麦デンプン, グルテンフリー食品) は, MALDI-TOF MS と研究室調製したサンドイッチ ELISA (Camafeita, *et al.*, 1997b) とで同時に分析された。MS 結果は, 4-100mg グリアジン /kg の範囲で直線関係あり, そして ELISA のそれと良い相関性がある。セリアック病, 毒プロラミンの比較では, グリアジン, セカリン, ホールデン, アベニンが特徴的なマスプロフィールを示し, 穀物種の差別ができた (Camafeita, *et al.*, 1998)。

小麦, らい麦, オートムギの異なった品種がほぼ同定され, 一方, 大麦ホールデンは異なった品種で各マスプロフィールが生じた。最近, MALDI-TOF MS はビール中のグルテンによるペプチドを特徴づけることに利用された (Iametti, *et al.*, 2005, 2006), それはサンドイッチ ELISA では検知できなかった。最も相対的な違いはビール中のペプチドの MS プロフィールは低マス域 (<5000) であった。異なった国

でつくられたビールはそれぞれ大きくペプチドのプロフィールが異なるので, このことは各工場での実施はセリアック病ペプチドの存在と定量測定に重要な役割りを演じるだろう。著者らは HPLC-MS をつなぐことによってアミノ酸配列の細かな分析をだし, それがセリアック病患者にとって必要な, 性質, 原因, 可能な有毒性を明らかにする必要手段であると提案する。

全体的に MALDI-TOF MS は食品中のグルテンの決定, 定量測定 of 非免疫的アプローチに高度の価値のあるものであるということだ。その限界はこの実験道具であり, そのため 2-3 の特別の研究室では分析を行なう事が出来る。この研究所のサービスは免疫法の信頼性をはっきりさせるのに特別に使うべきであり, 選択的疑問サンプルの分析に使うべきである。

カラムクロマトグラフィー

カラムクロマトグラフィーはずっと穀物タンパク質の特徴づけ, 分離, 定量に使われてきた。特別にはゲル濾過 (GP) クロマトグラフィーは分子量のちがいでわけ, 逆相 (RP) クロマトグラフィーでは異なった疎水性によって分けるが, これらは広く用いられている。HPLC (Kruger and Bietz 1994) の用いたベースは, 分析の時間をかなり短くしたことで (時には 30 分以下)。タンパク質の検知, 定量はカラムから出てくる物を, UV 吸収で行いその範囲は 200-220nm である。この波長では吸収ユニットは高度にタンパク質と相関性ある (Wieser, *et al.*, 1998)。検知限界は約 1-2 μ g タンパク質である。欠点は, 検知技術はグルテンと非グルテンタンパク質の間の違いを見つけられぬことで, そこで複合食品の分析には使えない。にも関わらず, カラムクロマトグラフィーは利用価値がある。たとえば成分の決定, 対照タンパク質の定量 (Van Eckert *et al.*, 2006) あるいは他の方法の結果の判断に価値がある (Wieser, *et al.*, 1994)。しかしながら, 特別な場合にはカラムクロマトグラフィーはグルテン測定に用いる事が出来る。GP-HPLC の Sephadex 200HR への利

用は、一連の小麦デンプン中のグリアジンと全グルテン両方の定量に用いられ、次のステップの方法によった (Wieser and Antes, 2002) ; 60% エタノール (グリアジン) 10mL で 1g の抽出, あるいは 50% 2-propanol + 還元剤 (全グルテン) での抽出, 遠心分離, 真空遠心で 4mL の上清の乾燥, 500mL 溶出用溶剤中に溶かす, 100-200 μ L をカラムにうちこみ, UV 吸収は 210 あるいは 205nm の吸収測定。23 デンプンサンプルの分析はグリアジン含量が 15-574 μ g/kg であった (Mieser and Seilmeire 2003)。平均変異係数 (average coefficient of variation) は 2 サンプルでは $\pm 2.6\%$ であった。グリアジンのグルテニンに対する比率は大きな相違が見られ (0.2-4.9), それは計算したグリアジン $\times 2 =$ グルテンで Draft Revised Codex Standard による計算とは合わない。

さらに小麦デンプンに加えて、他の生の材料でグルテンフリー食品の生産に用いられるものがテストされた。グルテン測定は本質的にはアップルファイバー, ソバひきわり, スパイスミックス, クルミ, きび, 米粉で可能であった。脱脂ミルク, 大麦粉では、しかしながら, GP-HPLC 法の正確な測定を邪魔する成分が入っていた。結論的にはカラムクロマトグラフィーは特別な場合にはグルテン分析の別報として使え、他の方法のコントロールになる。

結論と今後

小麦グルテンがセリアック病を悪化させるということが認知 (Dicke, 1950) されてから、比較的ゆっくりのプロセスでセリアック病—毒タンパク質の定量的測定に対する方法が進歩して来た。約 30 年がはじめの Codex Standard for Gluten Free Foods 1981 年の出来るまでにかかり、そこでは窒素測定の方法により小麦デンプンの分析のみという制限があった。このスタンダードの改訂は進行中で、the Draft Revised Codex Standard は Codex procedure のステップ 6 の段階である。一般的に大きな問題は、分析物 (グルテンタンパク質) がタンパク質成分及び

毒性の点で不完全な定義であることと、腹立たしい要因はグルテンタンパク質が食品加工中、しばしば変性するかあるいは酵素分解する点である。さらに適当な対照タンパク質の選択が、正確な結果を得るのに重要である点である。多くの分析法が免疫化学, PCR, MS, HPLC を基礎としてこの 25 年間発展してきたが、しかし僅か 2-3 のものが最小の要求性, 感度, 選択性, 正確性, スピード利用性の点で合致したのみである。そこで Draft Revised Codex Standard は 1 つの方法の一般的アウトラインのみだし、免疫化学的なアプローチを薦めている。

ELISA は最もしばしば用いられる免疫測定法であり、異なった試験システムがマーケットに出て、一部リングテストもうまくいっている。サンドイッチ ELISA は Skeritt & Hill (1990) によってすすめられ、そこには加熱安定 ω -gliadin に対し MAb が含まれていて、長年用いられてきた。

この方法はしかしながら小麦, ライ麦, 大麦種, 各種の ω -タイプタンパク質が各異なった性質のため、システムのエラーを生じる。さらに最近、サンドイッチ ELISA は MAb R5 を使い、小麦, ライ麦, 大麦プロラミンのセリアック病ウイルスエピトープを認知した。検知リミットは 3mg グルテン/kg であり、このテストはオートムギ, 非毒性穀物とはクロス反応しない。加熱処理あるいはマトリックス効果から生じる問題は、このアッセイでは解決された。加水分解されたものに対して、修正した競合的 ELISA が提案された。試験キットは PWG グリアジンを対照タンパク質として含み、最近一括使用のために生産された。2005 年に R5 ELISA は the Codex Committee of Methods of Analysis and Sampling (CCMAS) よりタイプ I 法として推奨された。最近の Revised Draft Codex Standard and Proposed method は、完全ではないけれどもそれは Codex Std 118-1981 に比べて重要な進歩を示している。近々では ELISA はグルテン分析に対しての最初の選択をとるが、しかし変法が ELISA の結果をコントロールするのに必要

となるだろう。2点重要な問題が残っている。はじめのものはオート麦のセリアック病毒性の最終的な決定のことである。ここで問題は抗アベニン抗体及び参照アベニンが試験システムに含まれるかどうかの問題である。2番目のことは、グルテン=2X プロラミンの計算式が根拠がなく、グルテリンに対しプロラミンの比率は強く穀物品種、種類にかかっており、穀物の違いによる加工品中で異なるためである。最近

の研究は、小麦グルテニンがプロラミン同様セリアック病を悪化させる事を示し、相応するライ麦、大麦からのタンパク質でも有毒であった。しかしながら最近ではグルテニンに対する一致した抗体も比較タンパク質もない。そこでさらに仕事はプロラミンとグルテリン両方の決定方法を進歩させ、小麦、ライ麦、大麦、可能性あるオートムギ貯蔵タンパク質の全タイプを含む対照材料の生産を進めている。

参考文献

1. Allmann, M., Candrian, U., Hofelein, C., and Luthy, J.: Polymerase chain reaction (PCR): a possible alternative to immunochemical methods assuring safety and quality of food. *Z. Lebensm. - Wiss. Untersuch. Forsch.* **196**, 248-251. 1993.
2. Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG. 1984.
3. Untersuchung von Lebensmitteln. Immunologischer Nachweis von Proteinen in Backwaren (einschließlich Brot und blutenfreie Backwaren) und Süßwaren. Wien, Zurich ; Beuth-Verlag GmbH.
4. Anderson, R. P. and Wieser, H.: Medical applications of gluten-composition knowledge. In: Wrigley, C., Bekes, F., and Bushuk, W.: eds, *Gliadin and Glutenin the Unique Balance of wheat Quality*. St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemists, pp. 387-409. 2006.
5. Arentz-Hansen, H., McAdam, S. N., Molberg, Ø. *et al.*: Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadins rich in proline residues. *Gastroenterology* **123**, 803-809. 2002.
6. Aubrecht, E. and Toth, A. Investigation of gliadin content of wheat flour by ELISA method. *Acta Aliment.* **24**, 23-29. 1995.
7. Berger, E. and Freudenberg, E.: Bemerkungen über die antigenen Eigenschaften von Abbaustufen des Gliadins. *Ann. Paediatr.* **196**, 238-243. 1961.
8. Bermudo Redondo, M. C., Griffin, P. B., Garzon Rasanz, M., Ellis, H. J., and Ciclitira, P. J.: Monoclonal antibody-based competitive assay for the sensitive detection of coeliac disease toxic prolamins. *Anal. Chim. Acta* **551**, 105-114. 2005.
9. Camafeita, E., Alfonso, P., Acevedo, B., and Mendez, E.: Sample preparation optimization for the analysis of gliadins in food by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **32**, 444-449. 1997a.
10. Camafeita, E., Alfonso, P., Mothes, T., and Mendez, E.: Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric micro-analysis: the first on-immunological alternative attempt to quantify gluten gliadins in food samples. *J. Mass Spectrom.* **32**, 940-947. 1997b.
11. Camafeita, E., Solis, J., Alfonso, P., Lopez, A., Sorell, L., and Mendez, E.: Selective identification by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of different types of gluten in foods made with cereal mixtures. *J. Chromatogr. A* **823**, 299-306. 1998.
12. Chirido, F. G., Anon, M. C., and Fossati, C. A.: Optimization of a competitive ELISA with polyclonal antibodies for quantification of prolamins in foods. *Food Agric. Immunol.* **7**, 333-343. 1995.
12. Chirido, F. G., Anon, M. C., and Fossati, C. A.: Development of high-sensitive enzyme immunoassays for gliadins quantification using the streptavidin-biotin amplification system. *Food Agric. Immunol.* **10**, 143-155. 1998.
13. Ciclitira, P. J. and Lennox, E. S.: A radioimmunoassay for α - and β -gliadins. *Clin. Sci.* **64**, 655-659. 1983.
14. Codex document CX/NFSDU 00/4 Draft revised standard for gluten-free foods. Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Codex Alimentarius Commission. Codex Standard. Rome:WHO. 2000.

15. Codex document CL 2006/5-NFSDU. Draft revised for gluten-free foods. Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Codex Alimentarius Commission. Codex Standard. Rome:WHO. 2006.
16. Codex Stan 118-1981 Codex Standard for Gluten-Free Foods. Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Codex Alimentarius Commission. Codex Standard. Rome: WHO; p. 118. 1981.
17. Codex Standard for the Labelling of Prepacked Foods. Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Codex Alimentarius Commission. Codex Standard. ROME; WHO. 2001.
18. Dahinden, L., von Büren, M., and Lüthy, J.: A quantitative competitive PCR system to detect contamination of wheat, barley or rye in gluten-free food for coeliac patients. *Eur. Food Res. Technol.* **212**, 228-233. 2001.
19. Denery-Papini, S., Nicolas, T., and Popineau, Y.: Efficiency and limitations of immunochemical assays for the testing of gluten-free foods. *J. Cereal Sci.* **30**, 121-131. 1999.
20. Denery-Papini, S., Boucherie, B., Larré, C. *et al.*: Measurement of raw, heated and modified gluten after limited hydrolysis. In: Stern, M. ed. Proceedings of the 16th Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity. Zwickau: Verlag Wissenschaftliche Scripten. pp. 71-73. 2002.
21. Dewar, D. H., Amato, A., Ellis, H. J. *et al.*: The toxicity of high molecular weight glutenin subunits of wheat to patients with coeliac disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **18**, 483-491. 2006.
22. Dicke, W. K.: Coeliac disease. Investigation of the harmful effects of certain types of cereals on the patients with coeliac disease. PhD thesis. University of Utrecht. 1950.
23. Dona, V. V., Fossati, C. A., and Chirido, F. G.: Interference of denaturing and reducing agents on gliadin/antibody interaction In: Stern, M. ed. Proceedings of the 18th Meeting of the Working Group on Prolamin. Analysis and Toxicity. Zwickau: Verlag Wissenschaftliche Scripten. pp. 51-57. 2004.
24. Ellis, H. J., Doyle, A. P., Wieser, H., Sturgess, R. P., Day, P., and Ciclitira, P. J. Measurement of gluten using a monoclonal antibody to a sequenced peptide of α gliadin from the coeliac-activating domain I. *J. Biochem. Biophys. Methods* **28**, 77-82. 1994.
25. Ellis, H. J., Rosen-Bronson, S., O'Reilly, N., and Ciclitira, P. J.: Measurement of gluten using a monoclonal antibody to a coeliac toxic peptide of gliadin. *Gut* **43**, 190-195. 1998.
26. Ellis, H. J., Pollock, E. L., Engel, W., Fraser, J. S., Rosen-Bronson, S., Wieser, H., and Ciclitira, P. J.: Investigation of putative immunodominant T cell epitopes in coeliac disease, *Gut* **52**, 211-217. 2003.
27. Ellis, H. J., Dewar, D. H., Gonzales-Cinca, N., Wieser, H., O'Sullivan, C., and Ciclitira, P. J.: Production of murine monoclonal antibodies to toxic gluten peptides and proteins, for use in ELISA. In: Stern, M., ed. Proceedings of the 20th Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity. Zwickau: Verlag Wissenschaftliche Scripten, pp. 53-57. 2006.
28. Ellis, H. J., Dewar, D. H., Gonzales-Cinca, N. *et al.*: Characterisation of monoclonal antibodies raised against HMW glutenin subunits In: Stern, M. ed. Proceedings of the 21th Meeting of the Working Group on Prolamin analysis and Toxicity. Zwickau: Verlag Wissenschaftliche Scripten, 2007.
29. Ferre, S., Garcia, E., and Mendez, E.: Measurement of hydrolysed gliadins by a competitive ELISA based on monoclonal antibody R5, analysis of syrups and beers, In: Stern, M. ed. Proceedings of the 18th Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity. Zwickau: Verlag Wissenschaftliche Scripten, pp. 65-69. 2004.
30. Fraser, J. S., Engel, W., Ellis, H. J., *et al.*: Coeliac disease: *in vivo* toxicity of the putative immunodominant epitope. *Gut* **52**, 1698-1702. 2003.
31. Freedman, A. R., Galfre, G., Gal, E., Ellis, H. J., and Ciclitira, P. J.: Monoclonal antibody ELISA to quantitate wheat gliadin contamination in gluten-free foods. *J. Immunol. Methods* **98**, 123-127. 1987.
32. Freedman, A. R., Galfre, G., Gal, E., Ellis, H. J., and Ciclitira, P. J.: Western immunoblotting of cereal proteins with monoclonal antibodies to wheat gliadin to investigate coeliac disease. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **85**, 346-350. 1988.
33. Friis, S. U.: Enzyme-linked immunoabsorbent assay for quantitation of cereal proteins toxic in coeliac disease. *Clin. Chim. Acta* **178**, 261-270. 1988.
34. Fritschy, F., Windemann, H., and Baumgartner, E.: Quantitative determination of wheat gliadins in foods by enzyme-linked immunosorbent assay. *Z. Lebensm. Untersuch. Forsch.* **181**, 379-385. 1985.
35. Galfre, G. and Milstein, C. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. *Methods Enzymol.* **73**, 3-75. 1981.

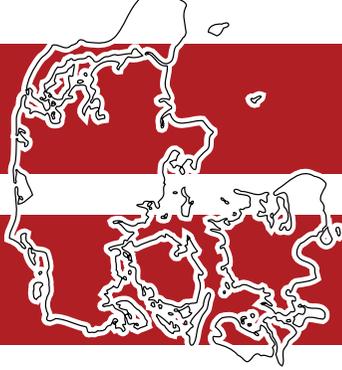
36. Garcia, E., Hernando, A., Toribio, T., Genzor, C., and Mendez, E.: Test immunochromatographic rapid assay: a rapid, highly sensitive and semi-quantitative test for the detection of gluten in foodstuffs. In: Proceeding of the 16th Meeting of the Working Group on Polamin Analysis and Toxicity. Zwickau: Verlag Wissenschaftliche Scripten, pp. 55-64. 2002.
37. Garcia, E., Hernando, A., Mujico, J. R., Lombardia, M., and Mendez, E.: Matrix effects in the extraction and detection of gliadins in foods by R5 ELISA and MALDI-TOF mass spectrometry. In: Stern, M. ed. Proceedings of the 18th Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity. Zwickau: Verlag Wissenschaftliche Scripten, pp. 59-64. 2004.
38. Gallrich, C., Schieberle, P., and Wieser, H.: Biochemical characterization and quantification of the storage protein (secalin) types in rye flour. *Cereal Chem.* **80**,102-109. 2003.
39. Henterich, N., Osman, A. A., Mendez, E., and Mothes, T.: Assay of gliadin by real-time immunopolymerase chain reaction. *Nahrung* **47**. 345-348. 2003.
40. Hemando, A., Garcia, F., Llorente, M. *et al.*: Measurements of hydrolysed gliadins in malts, breakfast cereals, heated/hydrolysed foods, whiskies and beers by means of a new competitive R5 ELISA. In: Stern, M. ed. Proceedings of 19th Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity. Zwickau: Verlag Wissenschaftliche Scripten, pp. 31-37. 2005.
41. Hill, A. S. and Skerritt, J. H.: Determination of gluten in foods using a monoclonal antibody-based competition enzyme immunoassay. *Food Agric. Immunol.* **2**. 21-35. 1990.
42. Iametti, S., Cappelletti, C., Oldani, A., Scafuri, L., and Bonomi, F.: Improved protocols for ELISA determination of gliadin in glucose syrups, *Cereal Chem.* **81**. 15-18. 2004.
43. Iametti, S., Bonomi, F., Ferranti, P., Picariello, G., and Gabrovska, D.: Characterization of gliadin content in beer by using different approaches. In: Stern, M. ed. 2005.
44. Proceedings of the 19th Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity . Zwickau: Verlag Wissenschaftliche Scripten, pp. 73-78.
45. Iametti, S., Bonomi, F., Ferranti, P., de Martino, A., and Picariello, G.: Characterization of peptides and proteins in beer by different approaches. 2006.
46. In:Stern, M. ed.: Proceedings of the 20th Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity. Zwickau: Verlag Wissenschaftliche Scripten, pp. 47-52.
47. Immer, U. and Haas-Lauterbach, S.: Ridascreen ○ R/Rida ○ R gliadin test systems. 2003.
48. In:Stern, M. ed.: Proceedings of the 17th Meeting of the Prolamin Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity. Zwickau: Verlag Wissenschaftliche Scripten, pp. 45-52.
49. Immer, U. and Haas-Lauterbach, S.: The question of extraction procedures. 2005a.
50. In:Stern, M. ed.: Proceedings of the 19th Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity. Zwickau:Verlag Wissenschaftliche Scripten, pp.45-52.
51. Immer, U. and Haas-Lauterbach, S.: Sandwich ELISA versus competitive ELISA: which approach is the more appropriate? 2005b.
52. In:Stern, M.ed.: Proceedings of the 19th Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity. Zwickau: Verlag Wissenschaftliche Scripten, pp.53-62.
53. Kahlenberg, F., Sanchez, D., Lachmann, I., Tuckova, L., Tlaskalva, H., Mendez, E., and Mothes, T.: Monoclonal antibody R5 for detection of putatively coeliac-toxic gliadin peptides, *Eur. Food Res. Technol.*, **222**, 78-82. 2006.
54. Kasarda, D. D.: Toxic cereal grains in coeliac disease. In: Feighery, C. and O'Farrelly, C. eds. *Gastrointestinal Immunology and Gluten-Sensitive Disease*. Dublin: Oak Tree Press, pp. 203-220. 1994.
55. Köppel, E., Stadler, M., Lüthy, J., and Hübner, P.: Detection of wheat contamination in oats by polymerase chain reaction (PCR) and enzymelinked immunosorbent assay (ELISA). *Z. Lebensw. Unters., Forsch.*, **206**. 399-403. 1998.
56. Kruger, E. and Bietz, J. A.: *HPLC-High-Performance Liquid Chromatography of Cereals and Legume Proteins*. St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemists. 1994.
57. Laffey, C., Madden, N., Fogarty, T., and Burke, P.: Gluten testing: an Irish perspective. 2005.
58. In:Stern, M.ed.: Proceedings of the 19th Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity. Zwickau: Verlag Wissenschaftliche Scripten, pp.63-68.

59. Lewis, J. H. and Wells, H. G.: The immunological properties of alcohol-soluble vegetable proteins. *J. Biol. Chem.* **66**, 37-48. 1925.
60. Malmheden Yman, I.: Detection of gluten/cereals in baby food samples collaborative study. In: Stern, M. ed. Proceedings of the 20th Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity. Zwickau: Verlag Wissenschaftliche Scripten. pp. 65-74. 2006.
61. Marsh, M. N., Morgan, S., Ensari, A., *et al.*: *In vivo* activity of peptides 31-43, 44-55, 56-68 of α -gliadin in gluten sensitive enteropathy (GSE). *Gastroenterology* **108**, A871. 1995.
62. Mckillop, D. F., Goslin, J. P., Stevens, F. M., and Fottrell, P. F.: Enzyme immunoassay of gliadin in food. *Biochem. Soc. Trans.* **13**, 486-487. 1985.
63. Meier, P., Windemann, H., and Baumgartner, E.: Zur Bestimmung des α -Gliadin-Gehaltes in glutenhaltigen und 'glutenfreien' erhitzten Lebensmitteln. *Z. Lebensm. Untersuch. Forsch.* **178**, 361-365. 1984.
64. Mendez, E., Camafeita, E., Sebastian, J. S., *et al.*: Direct identification of wheat gliadins and related cereal prolamins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* (Spec. Issue). S123-S128. 1995.
65. Mendez, E., Vela, C., Immer, U., and Janssen, F. W.: Report of a collaborative trial to investigate the performance of the R5 enzyme linked immunoassay to determine gliadin in gluten-free food. *Eur. J. Gastroentero Hepatol.* **17**, 1053-1063. 2005.
66. Molberg, Ø., Solheim, Flaete, N., Jensen, T., *et al.*: Intestinal T-cell responses to high-molecular-weight glutenins in celiac disease. *Gastroenterology* **125**, 337-344. 2003.
67. Morris, B. A. and Clifford, M. N.: Immunoassays in Food Analysis. London; Elsevier Applied Science. 1985.
68. Mujico, J. R., Lombardia, M., and Mendez, E.: Detection of wheat DNA in foods by a quantitative real-time PCR system: can the measurement of wheat DNA be used as a non-immunological and complementary tool in gluten technology? In: Stern, M. ed. Proceedings of the 18th Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity. Zwickau: Verlag Wissenschaftliche Scripten, pp.91-98. 2004.
69. Mujico, J. R., Hernando, A., Lombardia, M., *et al.*: Quantification of wheat, barley and rye contamination in oat samples by real-time PCR. In: Stern, M. ed. Proceedings of the 19th Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity. Zwickau: Verlag Wissenschaftliche Scripten. pp.87-94. 2005.
70. Mujico, J. R. and Mendez, E.: Simultaneous detection/quantification of wheat, barley and rye DNA by a new quantitative real-time PCR system. In: Stern, M. ed. Proceedings of the 20th Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity. Zwickau: Verlag Wissenschaftliche Scripten. pp. 39-45. 2006.
71. Osborne, T. B.: The proteins of the wheat kernel. Publication 84. Carnegie Inst., Washington, DC. 1907.
72. Ranz, A. I., Venteo, A., Vela, C., and Sanz, A.: Ingezim gluten. Immunoenzymatic assay for gluten detection using monoclonal antibody R5. In: Stern, M. ed.: Proceedings of the 18th Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity. Zwickau: Verlag Wissenschaftliche Scripten. pp. 37-49. 2004.
73. Ranz, A. I., Venteo, A., Cano, M. J., Vela, C., and Sanz, A.: Development of a new and rapid semiquantitative method for gliadin detection using R5 antibody. In: Stern, M. ed.: Proceedings of the 19th Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity. Zwickau: Verlag Wissenschaftliche Scripten. pp. 39-44. 2005.
74. Rumbo, M., Chirido, F. G., Fossati, C. A., and Anon, M. C.: Analysis of the effects of heat treatment on gliadin immunochemical quantification using a panel of anti-prolamin antibodies. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 5719-5726. 2001.
75. Sandberg, M., Lundberg, L., Ferm, M., and Malmheden, Yman, I.: Real time PCR for the detection and discrimination of cereal contamination in gluten free foods. *Eur. Food Res. Technol.* **217**, 344-349. 2003.
76. Schofield, J. D., Bottlomey, R. C., Timms, M. F., and Booth, M. R.: The effect of heat on wheat gluten and the involvement of sulphhydryl-disulphide interchange reactions. *J. Cereal Sci.* **1**, 241-253. 1983.
77. Seilmeier, W. and Wieser, H.: Comparative investigations of gluten proteins from different wheat species. IV. Reactivity of gliadin fractions and components from different wheat species in a commercial immunoassay. *Eur. Food Res. Technol.* **217**, 360-364. 2003.
78. Shewry, P. R. and Tatham, A. S.: The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. *Biochem. J.* **267**, 1-12. 1990.
79. Sima, A., van Eckert, R., and Pfannhauser, W.: Vergleich unterschiedlicher kommerzieller ELISA-Testsystem zur

- Bestimmung von Gluten. *Lebensmittelchemie* **53**, 40. 1999.
80. Skerritt, J. H.: A sensitive monoclonal-antibody-based test for gluten detection: quantitative immunoassay, *J. Sci. Food Agric.* **36**, 987-994. 1985.
 81. Skerritt, J. H.: Immunochemistry of cereal grain storage proteins, *Adv. Cereal Sci. Technol.* **9**, 263-338. 1998.
 82. Skerritt, J. H. and Hill, A. S.: Monoclonal antibody sandwich enzyme immunoassays for determination of gluten in foods. *J. Agric. Food Chem.* **38**, 1771-1778. 1990.
 83. Skerritt, J. H. and Hill, A. S.: Enzyme immunoassay for determination of gluten in foods: collaborative study. *J. AOAC* **74**, 257-264. 1991a.
 84. Skerritt, J. H. and Hill, A. S.: Self-management of dietary compliance in coeliac disease by means of ELISA "home test" to detect gluten. *Lancet* **337**, 379-382. 1991b.
 85. Skerritt, J. H. and Underwood, P. A.: Specificity characteristics of monoclonal antibodies to wheat grain storage proteins, *Biochem. Biophys. Acta* **874**, 245-254. 1986.
 86. Skerritt, J. H., Devery, J. M., and Hill, A. S.: Chemistry, celiac-toxicity and detection of gluten and related prolamins in foods. *Panminerva Med.* **33**, 65-74. 1991.
 87. Sollid, L. M.: Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 647-655. 2002.
 88. Sorell, L., Lopez, J. A., Valdes, I., *et al.*: An innovative sandwich ELISA system based on an antibody cocktail for gluten analysis, *FEBS Lett.* **439**, 46-50. 1998.
 89. Spaenij-Dekking, E. H. A., Kooy-Winkelaar, E. M. C., Nieuwenhuizen, W. F., Drijfhout, J. W., and Koning, F.: A novel and sensitive method for the detection of T cell stimulatory epitopes of α/β - and γ -gliadins. *Gut* **53**, 1267-1273. 2004.
 90. Spaenij-Dekking, L., Kooy-Winkelaar, Y., Stepniak, D., Edens, L., and Koning, F.: Detection and degradation of gluten. In: Stern, M. ed. Proceedings of the 20th Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity. Zwickau: Verlag Wissenschaftliche Scripten. pp. 59-64. 2006.
 91. Stern, M., Ciclitira, P. J., van Eckert, R., *et al.*: Analysis and clinical effects of gluten in coeliac disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **13**, 741-747. 2001.
 92. Sturgess, R., Day, P., Ellis, H. J.: *et al.*: Wheat peptide challenge in coeliac disease. *Lancet* **334**, 758-761. 1994.
 93. Theobald, K., Bohn, A., Thiel, M., Ulmer, W. T., and König, W.: Production of monoclonal antibodies against wheat flour components. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **72**, 84-86. 1983.
 94. Troncone, R., Vitale, M., Donatiello, A., Farris, E., Rossi, G., and Auricchio, S.: A sandwich enzyme immunoassay for wheat gliadin. *J. Immunol. Methods* **92**, 21-23. 1986.
 95. Vader, W., Kooy, Y., van Veelen, P. *et al.*: The gluten response in children with celiac disease is directed towards multiple gliadin and glutenin peptides. *Gastroenterology* **122**, 1729-1737. 2002.
 96. Valdes, I., Garcia, E., Llorente, M., and Mendez, E.: Innovative approach to low-level gluten determination in foods using a novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay protocol. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **15**, 465-474. 2003.
 97. Van de Wal, Y., Kooy, Y. M. C., van Veelem, P. *et al.*: Glutenin is involved in the gluten-driven mucosal T cell response. *Eur. J. Immunol.* **29**, 3133-3139. 1999.
 98. Van Eckert, R.: Methodological and practical experience in gluten analysis. *Ernährung/Nutrition* **17**, 163-165. 1993.
 99. Van Eckert, R., Scharf, M., Wald, T., and Pfannhauser, W.: Determination of proteins with ELISA-methods: doubtful quantitative results? In: Amado, R. and Battaglia, R. eds. Authenticity and Adulteration of Food-the Analytical Approach. Proceedings of the 9th European Conference on Food Chemistry, FECS Event No. 220. Vol. 1. Zürich: Swiss Society of Food and Environmental Chemistry, pp. 263-268. 1997.
 100. Van Eckert, R., Berghofer, E., Ciclitira, P. J. *et al.*: Towards a new gliadin reference material-isolation and characterisation. *J. Cereal Sci.* **43**, 331-341. 2006.
 101. Weisgerber, C.: ELISA for the detection of gliadin in food. In: Stern, M. ed. Proceedings of the 12th Meeting of the Working Group on Protamin Analysis and Toxicity. Zwickau: Eigenverlag, p.59. 1998.
 102. Wieser, H.: Cereal protein chemistry. In: Feighery, C. and O'Farrelly, C. eds, *Gastrointestinal Immunology and Gluten-Sensitive Disease*. Dublin: Oak Free Press, pp. 191-202. 1994.
 103. Wieser, H.: The precipitating factor in celiac disease. In: Howdle, P. D., ed. *Bailliere's Clinical Gastroenterology*,

- Vol. 9: Coeliac Disease. London: Bailliere Tindall, pp. 191-207. 1995.
104. Wieser, H.: Investigating the extractability of gluten proteins from wheat bread in comparison with flour. *Z. Lebensm. Untersuch. Forsch.* **A207**, 128-132. 1998.
105. Wieser, H.: Comparative investigations of gluten proteins from different wheat species. I. Qualitative and quantitative composition of gluten protein types. *Eur. Food Res. Technol.* **211**, 262-268. 2000.
106. Wieser, H. and Antes, S.: Development of a non-immunochemical method for the quantitative determination of gluten in wheat starch. In: Stern, M. ed. Proceedings of the 16th Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity. Zwickau: Verlag Wissenschaftliche Scripten. pp.19-23. 2002.
107. Wieser, H. and Kieffer, R.: Correlations of the amount of gluten protein types to the technological properties of wheat flours determined on a microscale. *J. Cereal Sci.* **34**, 19-27. 2001.
108. Wieser, H. and Seilmeier, W.: Determination of gliadin and gluten in wheat starch by means of alcohol extraction and gel permeation chromatography. In: Stern, M. ed. Proceedings of the 17th Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity. Zwickau: Verlag Wissenschaftliche Scripten. pp.53-57. 2003.
109. Wieser, H., Belitz, H.-D., Idar, D., and Ashkenazi, A.: Coeliac activity of the gliadin peptides CT-1 and CT-2. *Z. Lebensm. Untersuch. Forsch.* **182**, 115-117. 1986.
110. Wieser, H., Seilmeier, W., and Belitz, H.-D.: Quantitative determination of gliadin subgroups from different wheat cultivars. *J. Cereal Sci.* **19**, 149-155. 1994.
111. Wieser, H., Antes, S., and Seilmeier, W.: Quantitative determination of gluten protein types in wheat flour by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Cereal Chem.* **75**, 644-650. 1998.
112. Wieser, H., Bushuk, W., and MacRitchie, F.: The polymeric glutenins. In: Wrigley, C., Bekes, F., and Bushuk, W. eds. Gliadin and Glutenin: the Unique Balance of Wheat Quality. St. Paul. MN: American Association of Cereal Chemists. pp. 231-240. 2006.
113. Windemann, H., Fritschy, F., and Baumgarmer, E.: Enzyme-linked immuno sorbent assay for wheat α -gliadin and whole gliadin. *Biochim. Biophys. Acta* **709**, 110-121. 1982.
114. Wrigley, C., Corke, H., and Walker, C. E.: Encyclopedia of Grain Science. Vol.1-3. Amsterdam: Elsevier Academic Press. 2004.

白石カルシウムの炭酸カルシウム	
 <p>炭酸カルシウムとは？</p>	<p>古くから食品に使用されている安全性・吸収性に優れたカルシウム源です。 用途も栄養強化はもちろんのこと、練製品の弾力増強などの品質改良、粉体の流動性向上・固結防止といった加工助剤などその目的は多彩です。</p>
<p>分散性・混合性に優れたものや、飲料用として沈殿を抑制したタイプ等、品揃えしております。</p> <p>一般の栄養強化には「ホワイトン」</p> <p>機能を求めるならば「コロカルソ」</p> <p>飲料用には、スラリー状の「カルエッセン」</p> <p>詳細につきましては弊社営業担当にお気軽にお尋ねください。</p>	
 白石カルシウム株式会社	食品部：東京都千代田区岩本町1-1-8 TEL03-3863-8913 本社：大阪市北区中之島2-2-7 TEL06-6231-8265



デンマークのりんご

今回はデンマークの秋冬の果物、りんごについて紹介します。

デンマークの夏は6、7月に夏のピークを迎え、8、9月になると、年によっては夏のような気候が続く場合もありますが、徐々に寒くなり、秋めいてきます。10月になると、紅葉が始まり、11月には林や森の木々からは葉がなくなり、寒々しい光景に変わってきます。さて、9、10月になると、りんごの季節がやってきます。デンマークでも、りんごはどこにでもあるフルーツで、輸入品のりんごも売っていますが、デンマーク産のりんごがたくさん市場に出回ります。りんごは、日本同様に、もっとも馴染みのある秋冬のフルーツといってもいいでしょう（夏はやはりいちごやラズベリーが人気）。

りんごは、スーパーで手に入る以外にも、デンマークでは身近な存在です。郊外の庭付きの家に行くと、庭によくある木がりんごの木です。デンマークの気候に適しているためか、りんごの木は秋になるとたくさんの実をつけます。りんごがたくさんなるため、この季節になると、軒先に、箱に入ったりんごと「ご自由にお取りください」と書かれた札が置かれているのを見かけることが多々あります。木になるすべてのりんごを家庭で消費するのも大変なので、近所におすそ分けをするわけです。また、りんご狩りも、各地のりんご園で行われます。新鮮なりんごをたくさん仕入れるには、りんご狩りがとても便利です。キロ単位で、新鮮（もぎたて）なりんごを比較的安く仕入れることができます。大量にりんごを仕入れたいときなどにはとても便利です。



近所の庭で取れるリンゴはとにかく新鮮

さて、りんごの味についてですが、日本では、蜜入りのりんごなど、甘みのあるりんごが人気ですが、デンマークでは、蜜入りという謳い文句はなく、クリスピー（サクッとした食感）なりんごが人気です。りんごの種類（ブランド）も様々ですが、日本ほど、果物のブランドと価格が比例する市場ではありません。様々な種類のりんごが出回りますが、スーパーなどでは、「デンマーク産」を売りにしていることが多く、2キロほどのりんごを400円くらいで買えることもあります。

りんごがたくさん出回るこの季節ですが、りんごは、そのままフルーツとして食べるもよし、ジュースにするもよし、または、ケーキやタルトにするもよしと、食べ方はいろいろです。ここで一つ、デンマークならではの食べ方を紹介します。Gammeldags æblekage（ガメルデーズ・エーブルケー）というもので、直訳すると「昔ながらのアップルケーキ」になります。デンマーク

人の誰もが知っているケーキで、デンマークのりんごのデザートの代表格ではないでしょうか。このケーキの主要な材料は、りんごで、まずはたくさんのりんごの皮をむき小さく切り、少量の水で20分から30分煮ます。そして、煮たりんごを、ブレンダーなどでとろりとクリーム状にします。このクリーム状のものをÆblemousse(エーブルムース)といい、これを冷蔵庫で冷やしておけば、ヘルシーなおやつになります。エーブルムースは甘酸っぱく、クリーム状で食べやすいため、赤ちゃんの離乳食や小さな子供のおやつとしても使えます。さて、エーブルムースを作ったら、マカロン(アーモンドと卵白、砂糖で作ったお菓子)を細かく砕きます。また、パン粉をバターで炒め、香ばしい匂いと色になってきたら、フライパンから出して冷まします。この3つの材料を、順番に層にしていきます。エーブルムース、パン粉、マカロン、エーブルムース、パン粉...と層にしていき、最後にホイップクリームの層を作り、出来上がりです。Gammeldags æblekageは層にするのがポイントなため、ガラスの器などで作ると、きれいな層が横から見られます。層にせずに、それぞれの材料を、別々の器によそり、食べるときに、各自好きなだけ好きな材料をとるという方法でも可です。

Gammeldags æblekageの材料は日本でも手に入るものが多いので、デンマークのちょっとしたデザートを日本で味わうのに、家庭で作ってみるのもいいかもしれません。



デンマークの昔ながらのアップルケーキ



エーブルムースはりんごを煮たものをブレンダーでクリーム状にします

野山の花

— 身近な山野草の食効・薬効 —

城西大学薬学部 白瀧 義明 (SHIRATAKI Yoshiaki)

オオバコ *Plantago asiatica* L. (オオバコ科 Plantaginaceae)

連絡先：城西大学薬学部生薬学教室
shiratak@josai.ac.jp

晩秋から初冬にかけて、山道を歩いていると、道端で枯れかけた数本の穂を伸ばし平べったい何枚かの葉を広げた雑草を見かけることがあります。これがオオバコです。オオバコは東アジアを中心に広く分布し、日本では北海道から沖縄にかけて高地から平地までの野原や荒地、道端などに自生する雑草の一種で、別名を車前草しやぜんそうといい、車（牛車・馬車）が多く通る轍わだちによく生えていたことからこの名がついたようです。和名の由来は、葉が広く大きいことから「大葉子」と名付けられたといわれていますが、当て字だとする説もあります。地方によってはガエルツパ、ゲーロッパ、



写真1 オオバコ (葉と花)



写真2 オオバコ (道端に生えているところ)



写真3 オオバコ (花)



写真4 オオバコ (果実)



写真5 生薬：生薬：シャゼンシ（車前子）



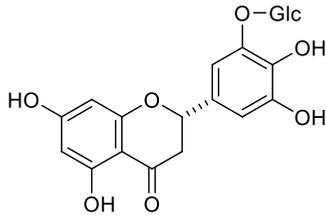
写真6 生薬：生薬：シャゼンソウ（車前草）

オンバコともよばれ、弱ったカエルをこの葉陰におくと元気になるという俗説からカエルバともいわれます。踏みつけに強く、人などが踏み歩く道端などでよく見られ、踏みつけが弱い所では、高くのびる性質を持たないので、他の草に負けてしまうようです。花茎のほか、茎は立たず、地面にうずくまっています。葉は葉と同じかそれより長い葉柄があり、楕円形、卵形もしくは、さじ形で、多くは根生葉となり根元からロゼット状に四方に広がり多数出ています。5～7本の葉脈が縦に平行に走り、基部に浅い切れ込みがあり、生育状態が良いと葉の縁は波打っています。風媒花で、春～秋にかけて10～30cmの長さの花茎を出し、花は花茎の頂に長い緑色の穂に密につき、白色もしくは淡い紫色の小花が下から上に向かって順次咲きます（無限花序）。がくは4枚あり、花冠はロート状で4裂し、雌性先熟で、雌しべが先にしおれてから、長くて目立つ白い雄しべが出ます。果実は蓋果と呼ばれる蓋がついた蒴果で楕円形、熟すると上半分が帽子状に取れ、中から4～6個の種子が現れます。種子は果実からこぼれ落ちるほか、雨などに濡れるとゼリー状の粘液を出し、動物など他のものに付いて遠くに運ばれます。葉や種子は咳止めなどの薬になり、若い芽は食用にもなります。また子供たちの遊びでは、花柄を根本から取り、2つ折りにして、2人が互いに引っ掛けあって引っ張り合い、どちらが切れないかを競うオオバコ相撲が知られ、スモトリグサ（相撲取り草）の別名もあります。

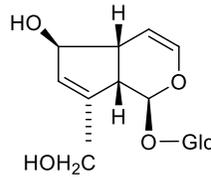
秋、果穂が成熟したころ、地上部を刈り取り、陽乾した後、手でもんで風選し、集めた種子は、生薬名をシャゼンシ（車前子、Plantaginis Semen）といい、また、花期に全草を抜き取り、土砂を洗い落としてから乾燥したものは生薬名をシャゼンソウ（車前草、Plantaginis Herba）といい、どちらも日本薬局方に収載されている生薬です。種子、全草とも煎じて用いられ、服用すると咳止め、下痢止め、消炎、利尿などの効果があるとされています。また、車前子は、漢方では、去痰、消炎、利尿、止瀉、鎮咳などを目標に、牛車腎気丸、五淋散、清心蓮子飲、竜胆瀉肝湯などに配剤されます。車前子の成分としては、粘液性の多糖として plantasan (D-xylose, L-arabinose, D-galacturonic acid, L-rhamnose, D-galactose からなる分子量約30万の多糖類), plantago-mucilage A (L-arabinose, D-xylose, D-glucuronic acid, D-galacturonic acid からなる分子量約150万の多糖類), フラボノイド配糖体の plantagoside, イリドイド配糖体の aucubin, フェニルエタノイド配糖体の acteoside (verbascoside), フェノール配糖体の syringin, その他 adenine, choline などが報告され、また、車前草の成分としてはイリドイド配糖体の aucubin, フラボノイド配糖体の plantagin, homoplantagin, フェニルエタノイド配糖体の plantamajoside, acteoside (verbascoside), トリテ

ルペンの ursolic acid などが報告されています。

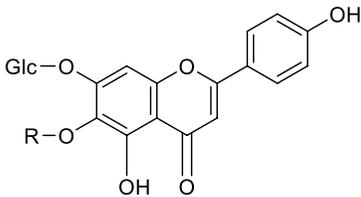
その他、日本で見かけるオオバコの仲間には、花茎の長いトウオオバコ *P. japonica*, 葉が長いへら型をしたへらオオバコ *P. lanceolata*, 1 蒴果中の種子が 8 ~ 16 個とオオバコに比べて多いセイヨウオオバコ *P. major* などがあります。



plantagose

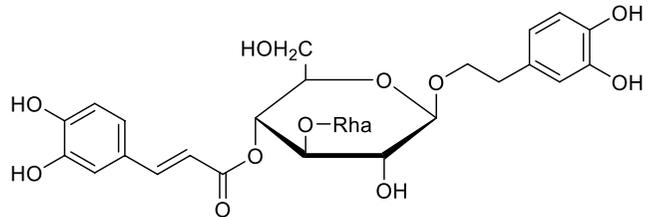


aucubin

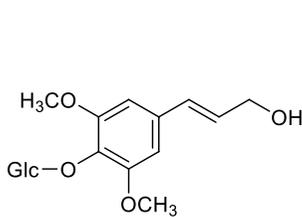


plantaginins
homoplantaginins

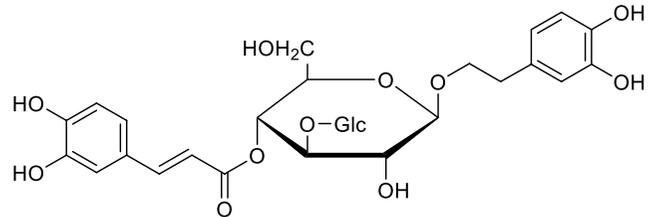
R
H
CH₃



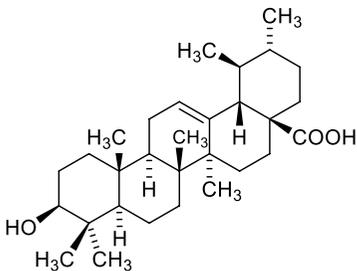
acteoside
(verbascoside)



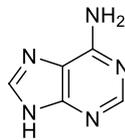
syringin



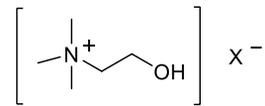
plantamajoside



ursolic acid



adenine



choline

Glc = glucose
Rha = rhamnose

X⁻ : アニオン

図1 成分の構造式

漢方の効能

Efficacy of traditional medicine “KAMPO”

(3) 東アジア文化圏の共通言語としての漢方 KAMPO, as a common language among the East Asian countries

門脇 修一郎 (KADOWAKI Shuichiro)*

ICD (International Classification of Diseases) という言葉をお聞きになったことがあるでしょうか。これは WHO による国際疾病分類です。疾病を定義し、統計を取り、診断、治療、研究の世界的な標準化を目指すのが狙いと思われまます。今年の 6 月 18 日に現行の ICD-10 から約 30 年ぶりになる改定版 (ICD-11) が公表されたことが話題になりました。ICD-11 の特徴の一つは「伝統医学の病態」という新たな章が設けられたことです。伝統医学と言っても世界に色々ありますが、最初の作業として古代中国に起源を持つ中国、日本、韓国の伝統医学の間で用語や病態表現を統一しようということになったようです。当然ですが英語表記で。中を捲ってみると「Qi, blood, fluids (気血水) disorders」のような記載に目が止まります。想像を超えるような大変な作業です。関係する日中韓の先生方に敬意を表したいと思います。

いずれにしても漢方が世界的に注目されつつあることは医薬関係者として嬉しいことです。私の場合、漢方体験は風邪の時に葛根湯を飲んだことくらいですが、今までに見聞きした事を振り返りながら漢方の文化的意味について少し考えてみたいと思います。

話に入る前に、まず日中韓の伝統医学に関連して使用される用語を整理しましょう。

	伝統医学の名称	医師の資格	処方される薬の名称
日本	漢方医学, 漢方	*	漢方薬
中国	中国伝統医学, 中医学	中医	中薬
韓国	韓医学, 韓方	韓方医	韓方薬, 韓薬

*日本では(西洋)医師免許を有する漢方専門医が漢方医療の中心を担う。

各国に独立した用語があるのは当然として、それら全体を統一する用語がないのが不便です。古代中国起源の伝統医学、伝統生薬などというのめかえってわかりにくいので、特に分けて表現する必要がない場合は、本稿では(広義の)漢方、あるいは漢方薬と表現することにします。「漢方」とは起源となる中国に敬意を表した良い表現だと思います。

前置きが長くなりましたが、まずは中医との出会いから話を始めましょう。以前勤務した会社に中医の資格を持つ中国人の社員がいて、色々話を聞く機会がありました。ご存知のように中国では西洋医学と漢方医学が二本立て別系統で教育されています。医師免許もそれぞれ独立しています。

連絡先: kadowaki-shu@384.jp

漢方医学の認定医が中医です。中医は漢方薬で患者を治療しますが、西洋薬の使用も（全部ではないと思いますが）認められていると聞きました。漢方薬中心に西洋薬も一部使用しながら、患者の日常に近いところで一次診療中心に活躍している中医の姿がイメージされます。西洋医学は主に二次診療、高次医療を担当するような形で両者大雑把に役割分担されているのではないかと推察されます。現在勤務する会社で中国駐在経験の長い社員に確認したところ同じような答えが返って来ました。現地の人はちょっと体調が悪い時など気軽に中医を訪問し、煎じ薬の入った大きな袋をもらって何となく安心して帰ってくるようだ。日常的な健康コンサルタントとして信頼されているのですね。もっとも、知り合いの中国人西洋医に言わせると一次診療からすべて西洋医が担っているとのことで、それも一面かなと思います。中国は広いから多様性があると理解すべきでしょう。

他国はどうでしょうか。韓国の事情に詳しい知人によると、韓国の制度も中国と同じで、教育、医療は2本立てということ。ただ最近では最初から西洋医のところに行く人が増えていると聞きました。それから最近偶然知った事ですが、シンガポールにも西洋医と漢方医がいるとか。中卒の東大教授として話題の柳川範之先生がシンガポールで暮らした中学時代の思い出として、病気の時には西洋医、漢方医、どちらに診てもらおうかとまず考えた「東大教授が教える独学勉強法」（草思社文庫）の中で書いておられます。

台湾に関してもちょっと触れておきましょう。1年ほど前に家内と台北を旅行する機会がありました。台湾も西洋医学、漢方医学の二本立てと思われるのですが、ホテルで現地のテレビを観ていると漢方薬のコマーシャルが頻繁に流れ、本場感を感じさせます。漢方薬が身近なものとして生活の中に浸透しているのがわかります。迪化街という観光名所があります。そこでは漢方薬店が道の両側に延々と続いて実に壮観です。薬膳にも使うのでしょうか、きくらげとかてきかがい菓とか土産物のように売っています。昔の大阪の道修町はどんな景色だったろうとつい思いを馳せてしまいます。

さて日本はどうでしょう。日本の医学教育の特徴の一つは漢方が西洋医学の教育の中に取り入れられている点にあると聞きます。その結果、日本の医師は漢方薬の知識を持ち、8割以上の医師が漢方薬の使用経験を有するというデータがあります。漢方が西洋医学の世界にうまく溶け込んでいるという見方もできますが、マクロに見れば漢方はいわゆる補完的な代替医療の位置づけにあると断言していいでしょう。国民医療における位置づけの大きさ、浸透性の深さの点で漢方は日本においてよりも中国や韓国でより重要な位置づけにあると言えるのではないのでしょうか。そこに違いを感じます。歴史を振り返ってみれば、幕末には漢方、蘭方、両勢力が拮抗していましたが、明治政府は国策として西洋医学を教育、医療の基本として採用することにしました。どちらを採用するかということに関しては色々議論があったようですが、最終的に漢方医は当代限りということで国家資格からは外されてしまったわけです。そこが中国、韓国との大きな違いでちょっと寂しい気もしますね。

同僚だった先ほどの中医の社員から漢方の講義を受けた事があります。陰陽、虚実、表裏、寒熱、気血水、上中下薬分類など、私の持つ漢方の知識から外れるものはありませんでした。未病概念も一致します。漢方の捉え方は日中あまり差がないというのがその時の印象でした。彼が、いつ誰にでもお薦めできる万能漢方薬として紹介してくれたのが「ほちゅうえつきとう補中益気湯」です。これについて少し調べてみました。

補中益気湯は李東垣^{リとうえん}（1180-1251）の処方とされます。原典は脾胃論。傷寒論以来の葛根湯などに比べると比較的新しい処方といえます。李東垣は胃腸機能を重視しました。その代表的な処方が補中益気湯です。その構成生薬は人参、白朮、黄耆、当帰、大棗、柴胡、陳皮、甘草、生姜、升麻です。実に10種類が配合されています。色々な病気に効くというのも納得です。特に気虚（心身の疲労、倦怠感、気力低下など）に有効とされ、専門医だけでなく一般医も含めてかなり頻繁に処方されるとか。日本の医師も中医も認識は同じようですね。漢方薬らしい漢方薬といえるのではないのでしょうか。

話は変わりますが、品川駅近くに漢方薬局の薬日本堂が経営する「ニホンドウ漢方ミュージアム」があります。通常の漢方薬局に加えて生薬の標本などを展示するコーナーや薬膳レストランが併設され、会議室もあって漢方薬の教育セミナーが開催されています。正に漢方薬のテーマパークの感があります。非常におしゃれな空間で色々楽しめます。是非一度、お出かけされることをお勧めします。

私がそこを訪れた時は昼食時でレストランはほぼ満席でした。私は薬膳カレーなんて普通のものを食べましたが、火鍋など本格的な薬膳料理もいただけるようです。中国人観光客も複数グループ訪れていました。ミュージアムの展示を真剣に覗いたり、レストランで薬膳料理を食べたりと。ああ同じ文化圏に居るのだなと不思議な親近感を覚えました。漢方は日本、中国の他、台湾、朝鮮半島を含む東アジア圏の人間にとって共通する伝統、価値観であり、底辺にある自然観、生命観の繋がりを感ずることができます。話題としても共有できます。共通言語と言っていいかもしれません。漢方の位置づけはそれぞれの国によって一様ではないように思えますが、同じ文化圏を共有する人間にとっての相互理解、親善のための貴重な財産として大切にしたいと思います。

現代チーズ学

編集

齋藤 忠夫 東北大学大学院農学研究科
 堂迫 俊一 雷印乳業株式会社 技術研究所
 井越 敬司 東海大学農学部



480 ページ超の大迫力！
 業界第一人者が集結！
 チーズ研究の必携書

チーズ研究の頭脳集結！
 熟成した研究成果を、
 じっくり書き上げた
 問い合わせ殺到の
 究極のチーズ技術書！

大好評

- B5 版 / 496 ページ
- 定価：(本体 7,500 円 + 税)
- 発行：食品資材研究会

The Contemporary Cheese Science

現代チーズ学 目次

1. チーズの歴史、食文化、分類および生産		
1.1 チーズの起源と歴史	大谷 元	
1.2 チーズの食文化	村山 重信	
1.3 チーズの分類と名称	村山 重信	
1.4 世界のチーズの生産・輸出入と消費	伊藤 晋治	
2. チーズの基礎科学		
2.1 乳の成分科学	石田 光晴	
2.2 チーズ製造の基本フロー	齋藤 忠夫	
2.3 乳酸菌スターターの科学	宮本 拓	
2.4 キモシンによる凝乳機構	阿久澤良造	
2.5 チーズの熟成機構	井越 敬司	
3. チーズの製造技術と衛生管理		
3.1 クリームチーズ	岩附 慧二	
3.2 モッツアレラチーズ	橋本 英夫	
3.3 カッテージチーズ	久米 仁司	
3.4 熟成型チーズ	田中 穂積	
3.5 キモシン酵素利用の現状	高見 修平	
3.6 プロセスチーズ	川崎 功博	
3.7 チーズの包装技術	佐々木敬卓	
3.8 チーズ製造の衛生管理	柳平 修一 鈴木 明 花形 吾朗	
4. チーズの機能性		
4.1 チーズの微細構造	木村 利昭	
4.2 一次機能	根岸 晴夫	
4.3 二次機能	井筒 雅	
4.4 三次機能	堂迫 俊一	
4.5 チーズとホエイに含まれるタンパク質の免疫科学	大谷 元	
5. ホエイ成分の高度利用		
5.1 チーズホエイとその成分別調製技術	元島 英雅 野島 一晃	
5.2 機能性オリゴ糖	浦島 匡	
5.3 機能性ホエイ味噌	六車三治男	
6. チーズの諸制度と知的財産権		
6.1 チーズの規格基準と表示規制	石田 洋一	
6.2 チーズの知的財産権	工藤 力	
7. 近未来のチーズ学		
7.1 チーズ製造技術の変遷と進歩	相澤 茂	
7.2 近未来のチーズ製造技術	市橋 信夫	
7.3 新しいタイプの機能性チーズの開発	松尾 光郎	
7.4 スターター乳酸菌における遺伝子組替え技術の応用	佐藤 英一	

◆ご注文は FAX またはメールにて FAX:042-312-0845 info@nfi-llc.co.jp

研究の成果をまとめた論文集

ゼミや講演などのテキスト

研究会や学会などの抄録

行事などの記念出版

人生の節目の記録

還暦や退官などの記念出版

会報・グループ研究誌

随筆・作品集

あなたの思いや、
研究の成果、人生史を
カタチにしてみませんか？

あなたの思いや、研究の成果などを、
伝え残すため、また、情報発信として、
本をしたためてみては如何でしょうか。

創刊から60年の、

「NEW FOOD INDUSTRY」の編集スタッフが
長年のノウハウを活かし、お手伝いいたします。

出版しました本を、

全国の一般書店で販売することも可能です。

出版についての経費や納期につきましてはご相談の上お見
積もり、スケジュール作成させていただきます。書店流通
につきましては相談の上、対応可能かどうか判断させてい
たいただきます。

共同出版・自費出版の
お手伝いをいたします。

◆ご問合せは電話またはメールにて TEL:042-312-0836 info@nfi-llc.co.jp

<http://www.newfoodindustry.com/>

ニューフードインダストリー 第60巻 第12号

印刷 平成30年 11月25日

発行 平成30年 12月1日

発行人 渡邊 力

編集人 今西 和政

発行所 エヌエフアイ合同会社

〒185-0012 東京都国分寺市本町3-7-23-302

TEL:042-312-0836(代表)

FAX:042-312-0845

振込先:三井住友銀行 国分寺支店 普通2312814

多摩信用金庫 国分寺支店 普通3073817

ゆうちょ銀行 〇一九店 当座0324817

印刷所 株式会社メイク

定価 本体2,000円 +税 (送料100円)

e-mail: newfood@newfoodindustry.com